

Aus dem Bereich Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

***In vitro* und *in vivo* Analysen der anti-kanzerogenen Aktivität von
Curcumin und Deketencurcumin am murinen malignen Melanom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

Medizinische Fakultät
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von: Indra Navina Dahmke
geb. am: 01.12.1979 in Koblenz

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Meese

2. Berichterstatter: PD Dr. M.W. Laschke

In Erinnerung an
meinen Vater,
der mir die Wissenschaft
nahe brachte

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Summary	1
2. Einleitung	5
2.1. Das maligne Melanom	5
2.2. Curcumin	6
2.2.1. Chemische Eigenschaften von Curcumin.....	9
2.2.2. Pharmakokinetik von Curcumin.....	10
2.2.3. Pharmakokinetik von Curcumin im Menschen.....	11
2.2.4. Verbesserung der Bioverfügbarkeit	11
2.2.5. Toxizität	12
2.2.6. Pharmakodynamik von Curcumin im Menschen.....	12
2.2.7. Molekulare Targets von Curcumin	13
2.3. MiRNAs	15
2.4. Eigene Fragestellung	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Labormaterialien	19
3.2. Zellbiologische Methoden	19
3.2.1. Verwendete Zelllinien.....	19
3.2.2. Kultivierung der Zellen	19
3.2.3. Isolation primärer humaner peripherer mononukleärer Zellen	20
3.2.4. Zellzählung	21
3.2.5. WST-1-Assay.....	22
3.2.6. Durchflußzytometrische Analysen	22
3.2.6.1. Bestimmung der Zytotoxizität	24
3.2.6.2. Bestimmung der Zellzyklusphasen	25
3.2.7. Fluoreszenzmikroskopische Analyse	25
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	26
3.3.1. Isolation der RNA aus Tumorproben	26
3.3.2. Hochdurchsatz-Analyse des miRNA Profils.....	27
3.3.3. <i>In silico</i> Analyse der zellulären Signalwege.....	29
3.3.4. Quantitative Real Time-PCR von miRNAs	29
3.3.4.1. Reverse Transkription	29
3.3.4.2. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	30

3.4. Chemische und proteinbiochemische Analysen.....	32
3.4.1. Curcuminpyrolyse	32
3.4.1.1. Pyrolyse	32
3.4.1.2. Analytische HPLC	32
3.4.1.3. Präperative HPLC von Deketencurcumin	33
3.4.2. Proteinbiochemie	34
3.4.2.1. Zytosolische und nukleäre Fraktionierung von Zelllysaten	34
3.4.2.2. Isolation von Proteinen aus Tumorgewebe	35
3.4.2.3. Gelelektrophorese	36
3.4.2.4. Western Blot-Transfer	38
3.5. Versuchstiere und Haltung.....	40
3.6. Diät.....	41
3.7. Tierexperimentelle Modelle	41
3.8. Tierexperimentelle Protokolle	41
3.9. Rückenhautkammermodell	43
3.9.1. Implantation der Rückenhautkammer.....	43
3.9.2. Generierung und Transplantation der Tumorsphäroide	44
3.9.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	45
3.10. Flankentumormodell	46
3.10.1. Generierung der Flankentumoren	46
3.10.2. Ultraschallmessung.....	47
3.11. Histologie und Immunhistochemie	48
3.12. Statistische Analysen.....	49
4. Ergebnisse	51
4.1. Auswirkungen pyrolytischer Prozesse auf Curcumin.....	51
4.1.1. Pyrolyse von Curcumin	51
4.1.2. Zelluläre Absorption von Curcuminderivaten	52
4.1.3. Zytotoxizität von Curcuminderivaten	53
4.1.4. Effekte von Curcuminderivaten auf den Zellzyklus	53
4.1.5. Effekte von Curcuminderivaten auf nukleäres NF- κ B	54
4.1.6. Zytotoxizität von Curcuminderivaten auf humane Monozyten.....	55
4.2. Effekte von diätischem Curcumin auf Melanome	56
4.2.1. Tumorwachstum und Neoangiogenese im Rückenhautkammermodell	56

4.2.2. Proliferation und Apoptose im Rückenhautkammermodell	58
4.2.3. Tumorwachstum und Neoangiogenese im Flankentumormodell	58
4.2.4. Expression von NF- κ B in Flankentumoren	60
4.2.5. MiRNA-Profil der Flankentumoren.....	60
4.2.6. Expression relevanter miRNAs in Melanomzelllinien.....	64
4.2.7. Putativ regulierte Signalwege.....	65
4.2.8. Targets der miRNA-205-5p	66
5. Diskussion	68
5.1. Auswirkungen pyrolytischer Prozesse auf Curcumin.....	68
5.2. Effekte von diätischem Curcumin auf Melanome	71
5.3. Schlussfolgerung und Ausblick	79
6. Literaturverzeichnis.....	81
7. Danksagung	94
8. Lebenslauf.....	95
9. Publikationen	96
10. Anhang	97

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>
<i>Akt</i>	<i>Proteinkinase Akt, Proteinkinase B</i>
<i>al.</i>	<i>alii</i>
<i>APC</i>	<i>Allophycocyanin</i>
<i>APS</i>	<i>Ammoniumpersulfat</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>BDMC</i>	<i>Bidemethoxycurcumin</i>
<i>bp</i>	<i>basepare</i>
<i>BRAF</i>	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
<i>C</i>	<i>Kohlenstoff</i>
<i>Ca</i>	<i>Kalzium</i>
<i>CD</i>	<i>cluster of differentiation</i>
<i>Cdk</i>	<i>cyclin-dependent kinase</i>
<i>c-KIT</i>	<i>Tyrosinkinase KIT</i>
<i>Cl</i>	<i>Chlorid</i>
<i>c-myc</i>	<i>myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
<i>COX-2</i>	<i>cyclooxygenase 2</i>
<i>CTLA-4</i>	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
<i>Cur, CUR</i>	<i>Curcumin</i>
<i>bidest.</i>	<i>bidestilliert</i>
<i>DEPC</i>	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
<i>DHC</i>	<i>Dihydrocurcumin</i>
<i>DKC</i>	<i>Deketencurcumin</i>
<i>DMC</i>	<i>Demethoxycurcumin</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
<i>DTT</i>	<i>Dithiothreitol</i>
<i>dUTP</i>	<i>2'-Desoxyuridin, 5'-Triphosphat</i>
<i>E2F1</i>	<i>Transkriptionsfaktor E2F1</i>
<i>EC₅₀</i>	<i>half maximal effective concentration</i>
<i>egr-1</i>	<i>early growth response protein 1</i>
<i>EMT</i>	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
<i>ErbB, HER, EGFR</i>	<i>human epidermal growth factor receptor/erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
<i>ESR1</i>	<i>estrogen receptor alpha</i>
<i>FACS</i>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>g</i>	<i>Gramm</i>
<i>G1</i>	<i>Gap1</i>
<i>G2</i>	<i>Gap2</i>

<i>GFP</i>	<i>green fluorescent protein</i>
<i>H</i>	<i>Wasserstoff</i>
<i>h</i>	<i>Stunde</i>
<i>Hepes</i>	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
<i>HIF-1α</i>	<i>Hypoxia-inducible factor-1alpha</i>
<i>hsa</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>ICAM-1</i>	<i>intercellular adhesion protein-1, CD54</i>
<i>IgG</i>	<i>Immunglobulin G</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>IRAK1</i>	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
<i>IVM</i>	<i>intravitale Fluoreszenzmikroskopie</i>
<i>IκB</i>	<i>inhibitor of kappa B</i>
<i>kDa</i>	<i>kiloDalton</i>
<i>KEGG</i>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<i>kg</i>	<i>Kilogramm</i>
<i>KG</i>	<i>Körpergewicht</i>
<i>M₁G</i>	<i>Malondialdehyd-DNA</i>
<i>mA</i>	<i>Milliampere</i>
<i>Me</i>	<i>Methylgruppe</i>
μ g	<i>Mikrogramm</i>
μ l	<i>Mikroliter</i>
μ m	<i>Mikrometer</i>
<i>mg</i>	<i>Milligramm</i>
<i>Mg</i>	<i>Magnesium</i>
<i>MHz</i>	<i>Megahertz</i>
<i>min</i>	<i>Minute</i>
<i>miR, miRNA</i>	<i>microRNA</i>
<i>miRISC</i>	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
<i>Mittel</i>	<i>Mittelwert</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter</i>
<i>mm</i>	<i>Millimeter</i>
<i>mmu</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>mol</i>	<i>Mol</i>
<i>mRNA</i>	<i>messengerRNA</i>
<i>mTOR</i>	<i>mammalian target of rapamycin (serine/threonine protein kinase)</i>
<i>n</i>	<i>number</i>
<i>Na</i>	<i>Natrium</i>
<i>NF-κB</i>	<i>nuclear factor-kappa beta</i>
<i>ng</i>	<i>Nanogramm</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>O</i>	<i>Sauerstoffatom</i>
<i>ORA</i>	<i>over-representation analysis</i>

<i>p53</i>	<i>Tumorprotein 53</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyakrylamid Gel Elektrophorese</i>
<i>PBS</i>	<i>posphate buffered saline</i>
<i>PCAF</i>	<i>P300/CBP-associated factor</i>
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
<i>PCR</i>	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PECAM, CD31</i>	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
<i>PI</i>	<i>Propidiumiodid</i>
<i>p. o.</i>	<i>per os</i>
<i>PPAR-γ</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PYR</i>	<i>pyrolysiertes Curcumin</i>
<i>qRT-PCR</i>	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>S</i>	<i>synthesis</i>
<i>s. u.</i>	<i>siehe unten</i>
<i>SDS</i>	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
<i>SEM</i>	<i>standard error of the mean</i>
<i>SP1</i>	<i>specificity protein 1 transcription factor</i>
<i>Src</i>	<i>Tyrosinkinase Src (sarcoma)</i>
<i>T</i>	<i>Tag</i>
<i>t</i>	<i>Tonne</i>
<i>TBS-T</i>	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
<i>TE</i>	<i>Tris-EDTA buffer</i>
<i>TNF-α</i>	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
<i>TPA</i>	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat</i>
<i>Tris</i>	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol</i>
<i>t-Test</i>	<i>Student's t-Test</i>
<i>US</i>	<i>Ultraschall</i>
<i>VAV</i>	<i>Protoonkogen vav</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>vascular cell adhesion molecule-1, CD 106</i>
<i>w/v</i>	<i>weight per volume</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>WST-1</i>	<i>water soluble tetrazolium-1</i>
<i>x g</i>	<i>n-fache Fallbeschleunigung</i>
<i>z.B.</i>	<i>zum Beispiel</i>
<i>°C</i>	<i>Grad Celsius</i>

1. Zusammenfassung

Seit mehr als 2000 Jahren wird das pflanzliche Polyphenol Curcumin in der traditionellen asiatischen Küche und für die medizinische Behandlung von Infektionen und inneren Erkrankungen eingesetzt. Trotz der geringen Bioverfügbarkeit deutet die niedrige Rate an Krebsneuerkrankungen in Indien auf eine anti-kanzerogene Aktivität von Curcumin hin. Obwohl eine Vielzahl an Publikationen die biologischen Effekte dieses Wirkstoffes beschreiben, sind grundlegende Mechanismen der anti-kanzerogenen Wirkung von diätischem Curcumin noch unklar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen haushaltsüblichen Kochens auf die anti-kanzerogene Aktivität von Curcumin sowie die Effekte von oral verabreichtem Curcumin auf das miRNA-Netzwerk in Melanomen untersucht.

Um die Frage zu beantworten, ob Kochen die anti-kanzerogenen Effekte von Curcumin verändert, wurde eine pyrolytische Zersetzung von Curcumin mit und ohne Kokosfett oder Olivenöl durchgeführt. Die Analyse der Produkte erfolgte mit Hilfe der *high-performance liquid chromatography* (HPLC) und zeigte eine große Zahl an hydrophileren Curcumin-Isoformen und Zerfallsprodukten. Dazu gehörte auch eine Substanz, die mittels Kernspinresonanzspektrometrie als „Deketencurcumin“ (1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one) identifiziert werden konnte. Dieses ist bisher nur als synthetisches Curcuminderivat beschrieben. Weiterhin wurde gezeigt, dass Deketencurcumin verglichen mit Curcumin eine stärkere Zytotoxizität gegenüber B78H1 Melanomzellen aufweist, die in einem G2-Arrest resultiert.

Die Analyse der Effekte einer 4 %igen Curcumin-Diät auf Melanome folgte in einem zweiten Studienabschnitt. Die Tumoren wurden hierfür entweder durch Injektion von murinen B78H1 Zellen in die Flanke generiert oder als Sphäroide in Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen transplantiert. Die Tiere hatten zwei Wochen vor der Inokulation der Tumorzellen bis zum Abschluss der Experimente freien Zugang zu Curcumin- oder Standardfutter (Kontrolle). Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde eine signifikante Reduktion des Wachstums und der Vaskularisierung der Tumoren in der Rückenhautkammer nachgewiesen. Immunhistochemische Färbungen histologischer Tumorpräparate gegen Ki-67 und CD31 belegten diese Resultate. Im Flankenmodell zeigte sich ein stärkerer anti-proliferativer Effekt der Curcumin-Diät. An den hier generierten Tumoren wurde eine Array-Chip-basierte Hochdurchsatzanalyse zur Evaluierung der miRNA-Expression vorgenommen. Eine hierarchische Clusteranalyse der tumoralen miRNA-Expression belegte eine substantielle Änderung des miRNA-Profiles. Hierbei wurde zum Beispiel mmu-miR-205-5p, verglichen mit den Kontrollen, mehr als 100-fach hochreguliert. Eine Bestätigung der Expressionslevel von vier relevanten miRNAs, mmu-miR-205-5p, mmu-miR-205-3p, mmu-miR-142-5p und mmu-miR-130b-3p in den Tumorproben

und humanen Melanomzelllinien erfolgte per quantitativer *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Analysen putativer Targets der durch diätisches Curcumin regulierten miRNAs zeigten, dass diese in den zellulären Signalwegen „O-Glykan-Biosynthese“, „Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum“, sowie verschiedenen Krebs-assoziierten Signalwegen überrepräsentiert waren. Western Blot-Analysen belegten, dass von diesen Targets anti-apoptotisches *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) signifikant in Curcumin-behandelten Tumoren herunterreguliert waren.

Zusammengefasst demonstrierten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Deketencurcumin, welches eine stärkere Toxizität gegenüber Krebszellen aufweist als Curcumin, durch pyrolytische Degradation während haushaltsüblichen Kochens gebildet wird. Zusätzlich wurde eine grundlegende Änderung der miRNA-Signatur in transplantierten Melanomen durch diätisches Curcumin nachgewiesen. Hierbei wurde die mmu-miR-205-5p am stärksten hochreguliert. Der Einfluss von oral appliziertem Curcumin auf ein bedeutendes regulatorisches Netzwerk in Tumoren wurde belegt und unterstreicht den potentiellen Nutzen von Curcumin in der Therapie des malignen Melanoms.

***In vitro* and *in vivo* analyses on the anti-cancerogenic activity of curcumin and deketen curcumin on murine malignant melanoma**

Summary

For more than 2000 years, the plant derived polyphenol curcumin has been widely used in traditional Asian cooking and medicinal treatment of infections and internal diseases. Despite its poor bioavailability, the low rate on cancer incidences in India suggests anti-cancerogenic activities of curcumin. Although a large number of publications characterize the biological effects of this compound, basic mechanisms on anti-cancer effects of dietary curcumin still remain elusive. Therefore, the impact of common household cooking on the anti-cancerogenic actions of curcumin as well as the effect of orally administered curcumin on the miRNA network in melanoma were investigated in the present thesis.

The question, whether cooking modifies the anti-cancerogenic actions of curcumin, was addressed by performing pyrolytic degradation of curcumin with and without coconut fat or olive oil. The products were analyzed by means of *high-performance liquid chromatography* (HPLC). A number of more hydrophilic curcumin isoforms and decomposition products were detected. These included a compound later identified by *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (NMR) as “dekene curcumin” (1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one), which has formerly been described as a synthetic curcumin derivative. Additionally, it was proven that dekene curcumin, compared to curcumin exhibits higher toxicity on B78H1 melanoma cells, resulting in G2 arrest.

In the second part of this thesis, the effects of a 4 % curcumin diet were tested on melanoma which were either established by injection of murine B78H1 cells in the flank or transplanted as spheroids into dorsal skinfold chambers of C57BL/6 mice. Curcumin diet or standard chow (control) was administered two weeks prior to inoculation of tumor cells until termination of the experiment. Intravital fluorescence microscopy of melanoma spheroids in the dorsal skinfold chamber revealed a significant decrease of tumor growth and vascularization. These results were supported by immunohistochemical detection of Ki-67 and CD31, both markers being substantially diminished in curcumin-treated spheroids. Moreover, curcumin treatment significantly reduced the growth of the flank tumors. High throughput chip-based array analysis was used to evaluate the miRNA expression levels in the flank tumors. A hierarchical cluster analysis on this data revealed a substantial alteration of the tumoral miRNA profile with mmu-miR-205-5p being over 100 times higher expressed when compared to controls. The expression levels of four relevant miRNAs (mmu-miR-205-5p, mmu-miR-205-3p, mmu-miR-142-5p and mmu-miR-130b-3p) in the tumor samples and human melanoma cell lines were confirmed by *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Putative targets of curcumin-regulated miRNAs

were enriched in “o-glycan biosynthesis”, “endoplasmatic reticulum protein processing” and different cancer-related pathways. Western Blot analyses revealed that of these targets anti-apoptotic *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2) and *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) were significantly down-regulated in curcumin-treated tumors.

In conclusion, the findings of this thesis demonstrate that deketene curcumin, which is formed as a consequence of pyrolytic degradation during common household cooking, exhibits a stronger toxicity on cancer cells when compared to curcumin. Additionally, dietary curcumin caused a profound alteration of the miRNA signature in engrafted melanoma with mmu-miR-205-5p being up-regulated most significantly. The impact of orally administered curcumin on an important regulatory network in tumors was documented and underlines the potential of curcumin in the therapy of malignant melanoma.

2. Einleitung

2.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Hautkrebs, der aus veränderten pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, entsteht. Die Transformation vom benignen Nävus zum malignen Melanom tritt vor allem sporadisch auf oder ist in seltenen Fällen die Ursache genetischer Mutationen (Dunki-Jacobs et al., 2013). Die Transformation erfolgt stufenweise und wird allgemein als Tumorgenese bezeichnet. Dieser Prozess basiert auf der Akkumulation von Mutationen und umfasst die Inaktivierung sogenannter Tumorsuppressorgene, die Aktivierung von Onkogenen sowie das Auftreten von Defekten in Haushaltsgenen (Abb. 1) (Hussein, 2004; Hanahan und Weinberg, 2011).

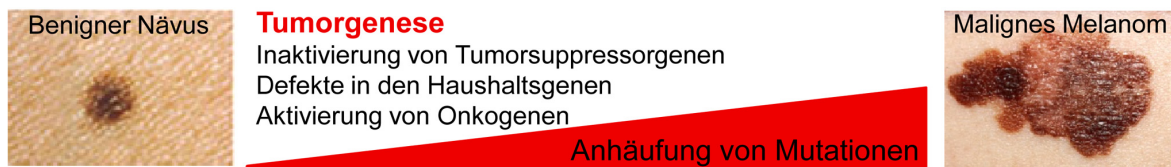


Abb. 1: Tumorgenese am Beispiel des malignen Melanoms (abgewandelt nach Hussein, 2004); Fotos: (National Cancer Institute, 2013)

Die Überexposition gegenüber ultravioletter (UV) Strahlung und Exposition in der Kindheit sind Risikofaktoren für die Erkrankung am kutanen malignen Melanom. Typische UV-Schäden am DNA-Strang basieren auf einer Dimerisierung benachbarter Pyrimidinbasen, die Genmutationen induzieren kann (de Gruij et al., 2001). Aufgrund des Rückgangs der Ozonschicht prognostiziert die *World Health Organization* (WHO) einen Anstieg der Hautkrebserkrankungen. So verzeichnete das Robert-Koch-Institut von 1980 bis 2008 in Deutschland eine Verdreifachung der am malignen Melanom Erkrankten und rechnete mit einer Steigerung der 5-Jahres-Prävalenz für 2012 um bis zu 10 % (Robert-Koch-Institut, 2012). Das maligne Melanom wird als aggressive Krebserkrankung eingestuft, da es im Verhältnis zur Tumormasse eine frühe Tendenz zur Metastasierung zeigt. Dies äußert sich darin, dass die Erkrankung für 90 % der Hautkrebs-bedingten Todesfälle verantwortlich ist (Garbe et al., 2008).

Die Vermeidung natürlicher und künstlicher UV-Strahlung steht im Vordergrund der Melanomprävention. Diese kann durch die Einnahme von nebenwirkungsarmen, pflanzlichen Wirkstoffen wie Grüntee-Flavonoiden, Proanthocyaniden und Curcumin, die potentiell anti-kanzerogen wirken, unterstützt werden (Jones und Katiyar, 2013).

Im Zentrum der Therapie des kutanen malignen Melanoms steht die chirurgische Entfernung (Exzision) mit einem Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe sowie einer Biopsie der regionären Lymphknoten. Abhängig von der klinischen Einstufung des Melanoms wird zusätzlich eine Strahlen-, Chemo- oder Adjuvanttherapie angeschlossen. So wird eine Strahlentherapie z.B. bei inoperablen Tumoren oder Lymphknotenmetastasen eingesetzt. Empfohlene Chemotherapeutika bei Fernmetastasierung sind DNA-alkylierende Carboxamide, wie Dacarbazin oder Temozolomid. Auch die Behandlung mit dem Alkaloid Vindesin, einem Mikrotubuli-Hemmer, ist verbreitet. Als adjuvante Therapien werden hochdosiertes Interleukin (IL)-2 und Interferon- α 2a oder 2b zur Immunstimulation appliziert, wenn ein erhöhtes Risiko für Metastasierungen besteht (Garbe et al., 2008). Aufgrund dieser Therapien und einer verbesserten Früherkennung erhöhte sich die 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern auf 87 % und bei Frauen auf 91 % (Robert-Koch-Institut, 2012). Da die Rezidivrate im fortgeschrittenen Tumorstadium bis zu 50 % beträgt, werden weitere Melanom-Therapeutika erforscht (Garbe und Schadendorf, 2003). In klinischen Studien wurden z.B. Inhibitoren häufig mutierter Proteinkinasen wie c-KIT, *B-rat fibrosarcoma* (B-Raf) oder *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) als neue Melanomtherapeutika getestet. Diese verlängern zwar das progressionsfreie Überleben von Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium (Grad III/IV), zeigen jedoch entweder schwere Nebenwirkungen oder induzieren schnell Tumorresistenzen (Eggermont und Robert, 2011; Sosman et al., 2012). Aus diesen Gründen besteht weiterhin ein dringender Bedarf an alternativen Strategien zur Therapie des malignen Melanoms.

2.2. Curcumin

Curcumin (Diferuloylmethan, 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) ist ein gelbes, pharmakologisch aktives Polyphenol, das als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff in den Wurzeln der Gattung *Curcuma* gebildet wird. Diese gehören der Familie der Ingwergewächse (*Zingiberaceae*) an und sind in Afrika, Australien und Südostasien beheimatet. Aus der getrockneten Wurzel von *Curcuma longa* (*Turmeric*, *Kurkuma*) lassen sich neben Peptiden und ätherischen Ölen bis zu 5 % an Curcuminoiden isolieren (Abb. 2). Weitere Arten, die häufig kultiviert werden, sind *Curcuma domestica*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aromatica* oder *Curcuma zedoaria*, die ebenfalls 2-5 % der orangegelben Curcuminoiden in Rhizomen enthalten (Sasikumar, 2005; Sharma et al., 2005).

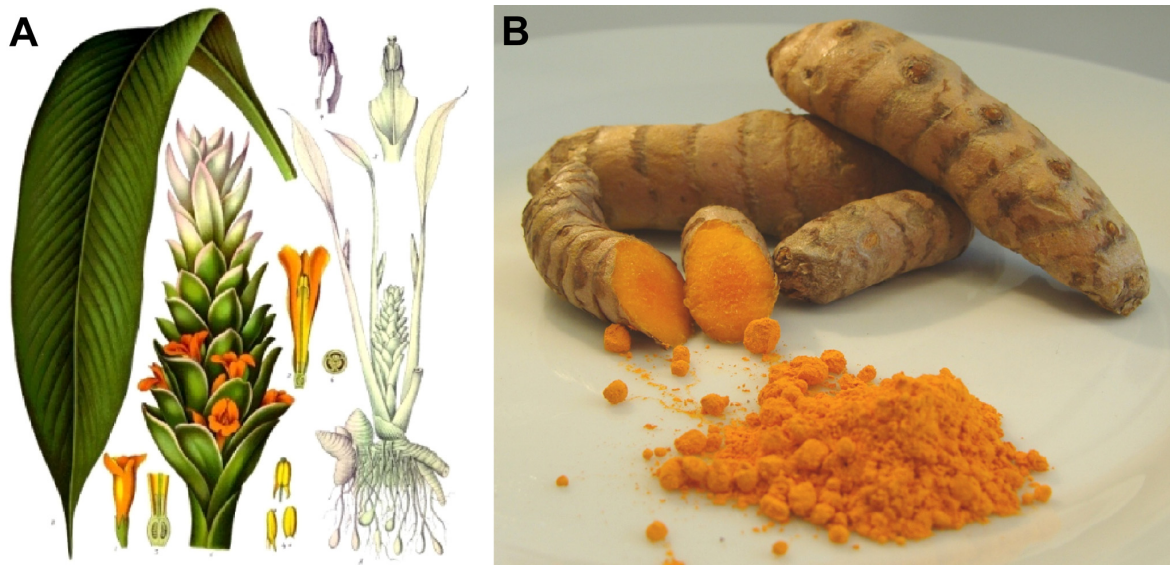


Abb. 2: *Curcuma longa*. **A:** Zeichnung der *Curcumapflanze* (Köhler, 1887). **B:** Foto der Rhizomen und Turmeric-Pulver.

Käuflich zu erwerbendes „Curcumin“ besteht in der Regel aus etwa 80 % Curcumin und enthält außerdem pflanzliche Biosyntheseintermediate mit einem ähnlichen Wirkspektrum, wie Demethoxycurcumin (~ 17 %) und Bidemethoxycurcumin (~ 3 %) (Abb. 3). Während in Europa und den USA Curcumin vor allem als färbender Lebensmittelzusatz (E100, *Natural Yellow 3*) Verwendung findet, sind der Verzehr und die Anwendung in der traditionellen Medizin in Südostasien weit verbreitet. Seit mehr als 2000 Jahren wird Curcumin in der traditionellen asiatischen Küche als Hauptbestandteil von *Curry* und zum Einfärben von Süßigkeiten genutzt und in der medizinischen Behandlung von Infektionen und inneren Erkrankungen eingesetzt (Ammon, 1991; Eigner und Scholz, 1999). Indien ist mit einem Anteil von 80 % (etwa 800.000 t in 2010) weltweiter Hauptproduzent von *Turmeric*, wovon 90 % auf dem heimischen Markt weiterverarbeitet werden (Universal Commodity Exchange, 2012). Der durchschnittliche Verzehr liegt bei 2,0-2,5 g *Turmeric* pro Tag und Person und entspricht einer Aufnahme von bis zu 100 mg Curcumin (Chainani-Wu, 2003). Im Vergleich dazu werden nach Schätzungen der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit im Vereinigten Königreich 0,8-3,3 mg/kg Körpergewicht pro Tag von Erwachsenen verzehrt (European Food Safety Authority, 2010).

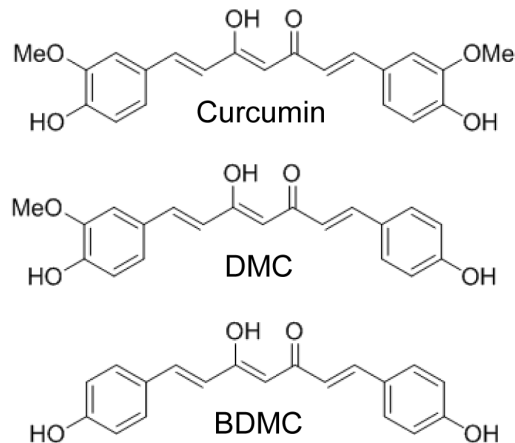


Abb. 3: Strukturformeln von Curcumin, Demethoxycurcumin (DMC) und Bisdemethoxycurcumin (BDMC)

Die Unterschiede in den Ernährungsgewohnheiten zwischen Asiaten und Europäern wurden in epidemiologischen Studien in Zusammenhang mit der niedrigen Rate an Darmkrebsneuerkrankungen, vor allem in Indien, gebracht (Mohandas und Desai, 1999; Sinha et al., 2003). Eine Studie über die zweite Generation nach Europa oder in die USA ausgewanderter Inder zeigten einen Angleich bezüglich der Krebsneuerkrankungen an die neuen Heimatländer auf. Die Autoren führten dies auf Umstellungen in der Ernährung zurück (Rastogi et al., 2008). Auch die Inzidenzrate für das maligne Melanom in Indien ist wesentlich geringer als die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland (Abb. 4) (WHO, 2008). Allerdings treten kutane Melanome generell seltener bei einer Bevölkerung mit starker Pigmentierung auf (Garbe et al., 2008).

Wie schon angesprochen, wird die Anwendung von Curcumin zur Chemoprävention von Melanomen diskutiert. Zahlreiche Arbeiten beschreiben die vielfältigen Effekte des Polyphenols auf die Haut. In präklinischen Studien wurde z.B. gezeigt, dass oral verabreichtes Curcumin Entzündungen der Haut reduziert, die Regeneration unterstützt und die Entstehung chemisch induzierter Hauttumoren in unterschiedlichen Tiermodellen verhindert (Limtrakul et al., 1997; Okunieff et al., 2006; Phillips et al., 2011). Aktuell werden klinische Studien zum Einsatz von Curcumin für die Behandlung der Radiodermatitis durchgeführt (*ClinicalTrials.gov*). Panahi et al. (2012) zeigten, dass 1 g/Tag oral verabreichtes Curcumin chronische Entzündungen in der Haut nach Verletzungen durch Senfgas abmildert. Weiterhin wurde in einer klinischen Phase I Studie belegt, dass eine dreimonatige Einnahme von 3-8 g Curcumin pro Tag die Heilung des Plattenepithelkarzinoms begünstigt (Cheng et al., 2001). Diese Arbeiten weisen auf den potentiellen therapeutischen Nutzen von oral applizierten Curcumin in der Therapie von kutanen Krebserkrankungen hin.

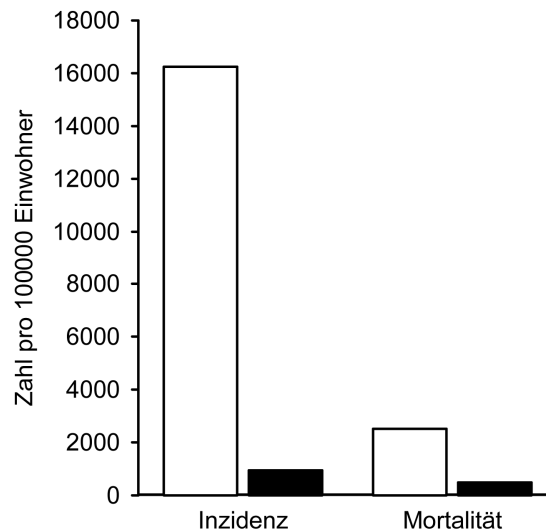


Abb. 4: Inzidenz- und Mortalitätsraten für das maligne Melanom pro 100.000 Einwohner in Indien (schwarze Balken) und Deutschland (weiße Balken) in 2008; basierend auf Daten der WHO (World Health Organization, 2011).

2.2.1. Chemische Eigenschaften von Curcumin

Curcumin hat eine molare Masse von 368,38 g/mol, einen Schmelzpunkt von 183°C und zeigt eine maximale Lichtabsorption bei 420 nm (Tonnesen und Karlsen, 1985; Sharma et al., 2005). Die chemische Aktivität von Curcumin beruht auf der molekularen Struktur: Curcumin ist ein bis- α -, β -ungesättigtes β -Diketon, dessen konjugiertes Doppelbindungssystem eine Keto-Enol-Tautomerisierung ermöglicht (Abb. 5) (Tonnesen und Karlsen, 1985; Sharma et al., 2005). Im sauren pH-Bereich liegt Curcumin relativ stabil in seiner Enolform vor und ist ein potentieller Protonendonator. Im basischen pH-Bereich kann Curcumin als Protonenakzeptor fungieren. Dies spiegelt sich in der Färbung wider, die von hellgelb im sauren bis zu bräunlich-rot im basischen Bereich wechseln kann, und Curcumin zu einem zuverlässigen pH-Indikator macht (Tonnesen und Karlsen, 1985).

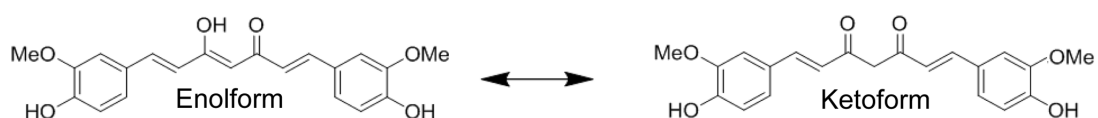


Abb. 5: Keto- und Enolformen von Curcumin

Die Reaktivität der Keto-Enol-Gruppen führt zu einer drastischen Herabsetzung der Stabilität von Curcumin, welches in basischer Pufferlösung eine Halbwertszeit von etwa 30 min besitzt, die durch eine Zugabe von Serum oder Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, deutlich erhöht werden kann (Wang et al., 1997). Im Basischen zerfällt Curcumin in unter-

schiedlichen Anteilen zu trans-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal, Ferulasäure, Feruloylmethan sowie Vanillin (Wang et al., 1997).

Curcumin ist gut in organischen Lösungsmitteln wie Alkoholen oder Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich, aber nur schwer in Wasser. Dies führt zu einer verringerten zellulären Absorption im Darm und folglich zu einer reduzierten Bioverfügbarkeit.

2.2.2. Pharmakokinetik von Curcumin

Präklinische und klinische Studien zur Pharmakokinetik von Curcumin belegten eine geringe systemische Bioverfügbarkeit sowie eine schnelle *first pass*-Metabolisierung und Ausscheidung der primären Substanz. Eine der ersten Studien von Wahlström und Blennow (1978) zeigte, dass oral appliziertes Curcumin in Sprague-Dawley Ratten aktiv von der Leber in die Galle transportiert und zu 75 % mit der Fäzes ausgeschieden wird. Nur ein geringer Anteil war in Plasma und Urin nachweisbar.

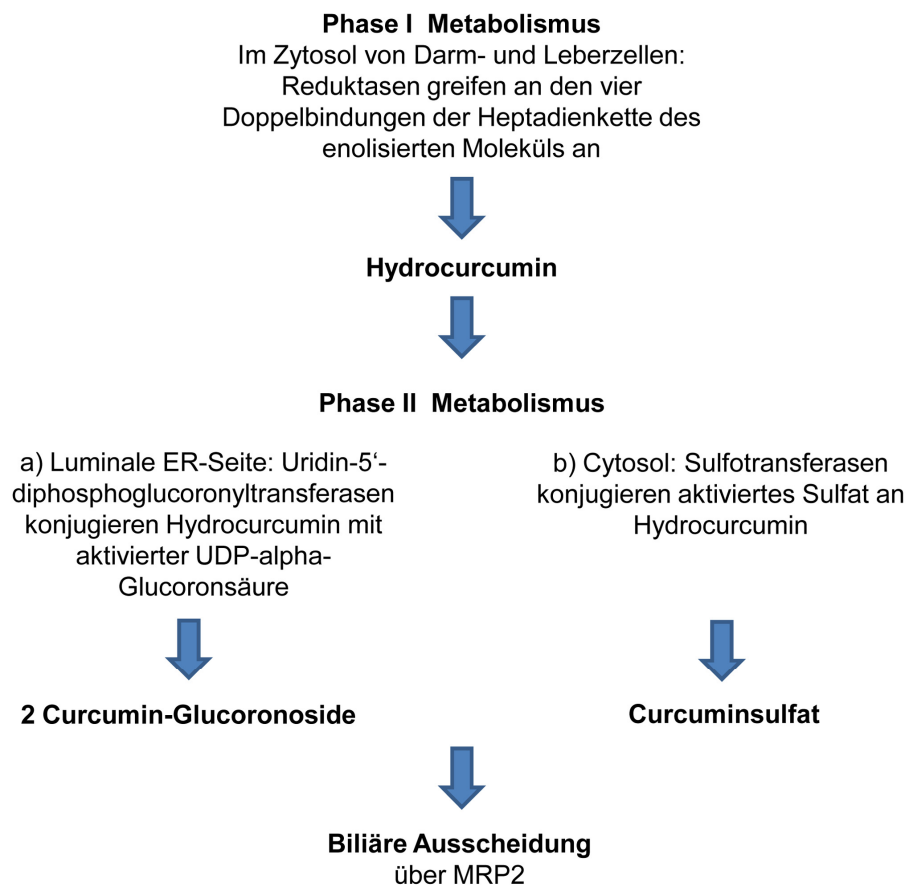


Abb. 6: Metabolisierung von Curcumin (abgewandelt nach Sharma, 2005)

Die biliäre Exkretion von Curcumin wird wiederum über das *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) vermittelt (Lee et al., 2012). In *in vitro* Versuchen wurde zudem

gezeigt, dass 90 % von oral appliziertem Curcumin innerhalb von 30 min im Phase-I-Metabolismus umgesetzt werden. Dies wird als ein Grund für die geringe Bioverfügbarkeit angesehen (Wahlstrom und Blennow, 1978).

Ravindranath und Chandrasekhara (1980) zeigten, dass bei oraler Administration von Curcumin nach 24 h noch 38 % im Zäkum und Dickdarm von Ratten nachweisbar ist, wobei ab einer Konzentration von 100 µg/10 ml eine Sättigung im *ex vivo* Rattendarm zu beobachten ist. Dies deutet auf eine Absättigung zellulärer Transportmechanismen für Curcumin hin (Srinivasan et al., 2007). Pan *et al.* (1999) untersuchten die Gewebeverteilung nach i.p. Administration von Curcumin und wiesen es nach 1 h in Nieren, Darm und Hirn nach. So wurde demonstriert, dass Curcumin die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Als Hauptmetabolite von Curcumin wurden Glucuronid- und Sulfat-konjugierte Produkte sowie Di-, Tetra- und Hexahydrocurcuminglucuronoside beschrieben (Abb. 6) (Ravindranath und Chandrasekhara, 1980; Pan et al., 1999).

2.2.3. Pharmakokinetik von Curcumin im Menschen

In klinischen Studien wurde eine vergleichbare Metabolisierung von Curcumin im Menschen nachgewiesen. Auch hier liegt ein Großteil des Polyphenols nach Durchlaufen des Phase I- und II-Metabolismus als mit Sulfaten bzw. Glucuronisiden konjugiertes Hydrocurcumin vor (Abb. 6) (Ireson et al., 2002; Vareed et al., 2008; Irving et al., 2013). Die Metabolite wiesen nach 3 h eine maximale Plasmakonzentration auf. Außerdem wurde ab einer p.o. Administration von 10 g eine Sättigung der Plasmakonzentration beobachtet, was ebenfalls auf die Absättigung der zellulären Transportmechanismen für Curcumin zurückgeführt wird (Vareed et al., 2008).

Irving *et al.* (2013) verabreichten Patienten 14 Tage vor einer kolorektalen Endoskopie 2,34 g/Tag Curcumin und detektierten durchschnittlich fast 50 µg/g in Darmbiopsien. Auch 40 h nach der letzten Applikation konnte dieses in der Kolonmukosa nachgewiesen werden. Daher schlossen die Autoren auf eine mögliche Akkumulation von Curcumin im Gewebe bei täglicher Administration (Irving et al., 2013).

2.2.4. Verbesserung der Bioverfügbarkeit

Strategien zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Curcumin verfolgen entweder eine Steigerung der zellulären Aufnahme oder eine Verminderung der Metabolisierungsrate. Um dies zu erreichen, wurde Curcumin mit anderen Substanzen, wie etwa Phospholipiden oder Cyclodextrin komplexiert, bzw. als Nanoemulsion gegeben, was die Aufnahme von Curcumin 1,5- bis 40-fach erhöht (Tonnesen, 2002; Kunwar et al., 2006; Zhongfa et al., 2012). Kurien *et al.* (2007) wiesen eine 12-fache Erhöhung der Bioverfügbarkeit von

Curcumin aufgrund einer verbesserten Wasserlöslichkeit durch Erhitzen nach. Außerdem wurde Curcumin mit Piperine oder Capsaicin co-appliziert, um den Phase II Metabolismus zu hemmen und das Polyphenol intrazellulär zu stabilisieren (Shoba et al., 1998; Suresh und Srinivasan, 2007).

2.2.5. Toxizität

Die Toxizität von Curcumin ist auch aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit gering. In einer prä-klinischen Studie fanden sich keine toxischen Befunde bei Mäusen nach einer oralen Administration von 10 g/kg Körpergewicht *Turmeric*. Bei einer oralen Applikation von 5 g/kg/Tag für sechs Monate zeigten Ratten ebenfalls keine toxischen Veränderungen (Sittisomwong, 1991). Im Allgemeinen stuft man eine Substanz mit einer mittleren letalen Dosis von 5-15 g/kg als nicht toxisch ein (Quincoces Suarez, 2010).

Auch beim Menschen zeigten sich bisher nur leichte Nebenwirkungen: In einer klinischen Phase I Studie wurden Patienten mit prämaligen Veränderungen bzw. einem hohen Krebsrisiko für 3 Monate mit bis zu 12 g Curcumin pro Tag behandelt. Bei 2 von 15 Patienten traten leichte Nebenwirkungen wie Sodbrennen, Kopfschmerzen oder Übelkeit auf (Cheng et al., 2001). Auch bei niedrigeren Dosen an Curcumin von 4-8 g wurden leichte gastrointestinale Nebenwirkungen beschrieben (6 von 26 Probanden) (Irving et al., 2013).

2.2.6. Pharmakodynamik von Curcumin im Menschen

Die Pharmakodynamik von Curcumin im Menschen wurde in Pilotstudien mit der Bestimmung der Aktivität von Glutathione S-transferase und des Gehaltes an Malondialdehyd-DNA (M_1G), zwei typischen Markern für oxidativen Streß, untersucht. Sharma *et al.* (2001) zeigten, dass durch die Einnahme von 440 mg Kurkuma-Extrakt für 29 Tage die Aktivität an Glutathione S-transferase in Lymphozyten um 59 % reduziert wird (Sharma et al., 2001). Garcea und Kollegen (2004, 2005) untersuchten die biologische Aktivität von oral appliziertem Curcumin und fanden in Biopsien von Kolonkarzinomen im Gegensatz zu anderen Geweben eine signifikante Reduktion an oxidativ induzierter M_1G . Diese Arbeiten belegen, dass Curcumin vor allem topisch seine anti-oxidative Wirkung entfaltet (Garcea et al., 2004; Garcea et al., 2005). Trotzdem erwies sich in klinischen Phase I und Phase II Studien die orale Verabreichung von Curcumin an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreas- oder Brustkrebs (mit oder ohne zusätzlicher Chemotherapie) als vielversprechend (Bayet-Robert et al., 2010; Carroll et al., 2011; Kanai et al., 2011).

2.2.7. Molekulare Targets von Curcumin

Curcumin zeigt eine breite pharmakologische Aktivität gegen Bakterien, Pilze, Viren und chemische Toxine (Ammon, 1991). Außerdem kann Curcumin endogene Prozesse, wie Entzündungen oder die Entstehung von Krebs, hemmen (Sharma et al., 2005).

Die krebshemmende Wirkung von Curcumin beinhaltet sowohl das „Blocken“ (*blocking*) von Karzinogenen, wie auch die „Suppression“ (*suppressing*) der Tumorgenese (Surh, 2003; Sharma et al., 2005). Die sogenannte Initiation gesunder Zellen zu „prä-neoplastischen“ Zellen durch Strahlung oder Karzinogene kann durch Curcumin verhindert werden (Limtrakul et al., 1997; Okunieff et al., 2006) (Abb. 7). Auch die Progression zu „neoplastischen“ Zellen kann Curcumin durch anti-inflammatorische, antiproliferative, anti-angiogene, pro-apoptotische, sowie epigenetische Effekte verzögern oder zum Teil revidieren (Surh, 2003; Fu und Kurzrock, 2010) (Abb. 7). Im Folgenden werden die krebshemmenden Eigenschaften von Curcumin näher beschrieben.

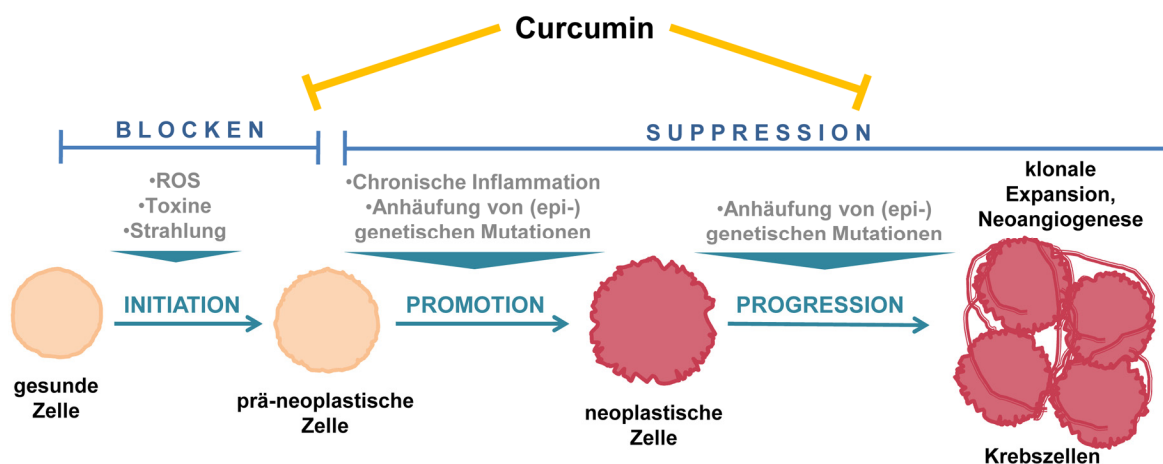


Abb. 7: Antikarzinogene Wirkung von Curcumin (abgewandelt nach Surh, 2003)

Die anti-inflammatorische Wirkung von Curcumin wird vor allem durch die Repression des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-kappa beta* (NF- κ B) und dessen Zielgene vermittelt. Dies geschieht sowohl über eine direkte Interaktion mit NF- κ B als auch über eine Aktivierung hemmender Kinasen (*inhibitor of kappa B* (I κ B) kinase). Die Translokation in den Nukleus und die nachfolgende Transkription von Entzündungs-vermittelnden Molekülen wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), IL-1, *intercellular adhesion protein-1* (ICAM-1, CD54) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1, CD106) wird auf diese Weise blockiert (Xu et al., 1997; Kumar et al., 1998; Plummer et al., 1999). Die anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Effekte spielen ebenfalls eine Rolle in der Neuroprotektion sowie der Regulierung des metabolischen

Syndroms durch Curcumin (Calabrese et al., 2008; El-Moselhy et al., 2011; DiSilvestro et al., 2012).

Anti-proliferative Wirkmechanismen erfolgen zum Beispiel über die Aktivierung von *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR- γ), der seinerseits die Expression von Cyclin D1 und *epidermal growth factor receptor* (EGFR, HER, ErbB) blockiert (Chen und Xu, 2005). Curcumin kann das Zellwachstum außerdem über die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies hemmen oder die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren *c-Myc* oder *p53* erreichen (Dinkova-Kostova et al., 1998; Han et al., 1999; Jana et al., 2004). Auch die Hemmung des β -Catenin-Signalweges, der die Aktivierung von Cyclin-D1 und Zell-Zell-Interaktionen vermittelt, ist für das Polyphenol beschrieben (Mahmoud et al., 2000; Jaiswal et al., 2002).

Der programmierte Zelltod (Apoptose) kann durch Curcumin abhängig von p53 über einen Anstieg des *Bcl-2-associated X protein* (Bax) induziert werden, was in einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase resultiert (Chiu und Su, 2009). Unabhängig von p53 führt eine verringerte Expression von Cyclin D1 zu einem G1/S-Arrest der Zellen (Singh et al., 1996; Chen und Huang, 1998).

Eine Inhibierung der Neoangiogenese durch Curcumin kann ebenfalls auf mehrere Weisen vermittelt werden. Neben der Induktion der Apoptose in Endothelzellen, wird die Expression des Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF), des Adhäsionsmoleküls *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1, CD31) und des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1 α) reduziert (Singh et al., 1996; Arbiser et al., 1998; Bae et al., 2006; Li et al., 2007).

Neuere Forschungsergebnisse beschreiben Curcumin außerdem als epigenetisch aktive Substanz (Fu und Kurzrock, 2010). Die Epigenetik beschäftigt sich mit stabil vererbten Faktoren, die den Phänotyp eines Individuums modifizieren, ohne dass die DNA-Sequenz verändert wird. Stattdessen wird die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren, die durch posttranslationale Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen bestimmt wird, reguliert. Auf diese Weise wird die Expression von Proteinen aber auch von sogenannten *micro* Ribonucleinsäuren (miRNAs, miRs) modifiziert. Eine Dysregulation der epigenetischen Mechanismen wurde für viele nicht-übertragbare Krankheiten wie Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs beschrieben (Taby und Issa, 2010). Curcumin hemmt spezifisch die DNA-Methyltransferase EZH2 sowie die Histonacetyltransferase p300/CBP. Außerdem moduliert Curcumin die Aktivität von Histondeacetylasen und miRNAs (Balasubramanyam et al., 2004; Morimoto et al., 2008; Liu et al., 2009; Fu und Kurzrock, 2010).

Curcumin wirkt also auf vielfältige Weise der Tumorgenese entgegen. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit von Resistenzentwicklungen von Tumoren gegenüber diesem

Polyphenol. Aus diesem Grund ist Curcumin ein potentieller Kandidat für neue Ansätze in der Therapie des malignen Melanoms.

2.3. MiRNAs

MiRNAs sind kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 17-25 Basenpaaren (bps), die innerhalb der Gruppe der Vielzeller (*Metazoa*) hoch konserviert vorliegen. Etwa 50 % aller Säugetiergene in proliferierenden Zellen werden post-transkriptionell durch miRNAs reguliert. Hierbei erfolgt die Bindung an korrespondierende *messenger RNAs* (mRNAs), um deren Translation zu hemmen bzw. einen Abbau der Target-mRNA zu induzieren (Abb. 8).

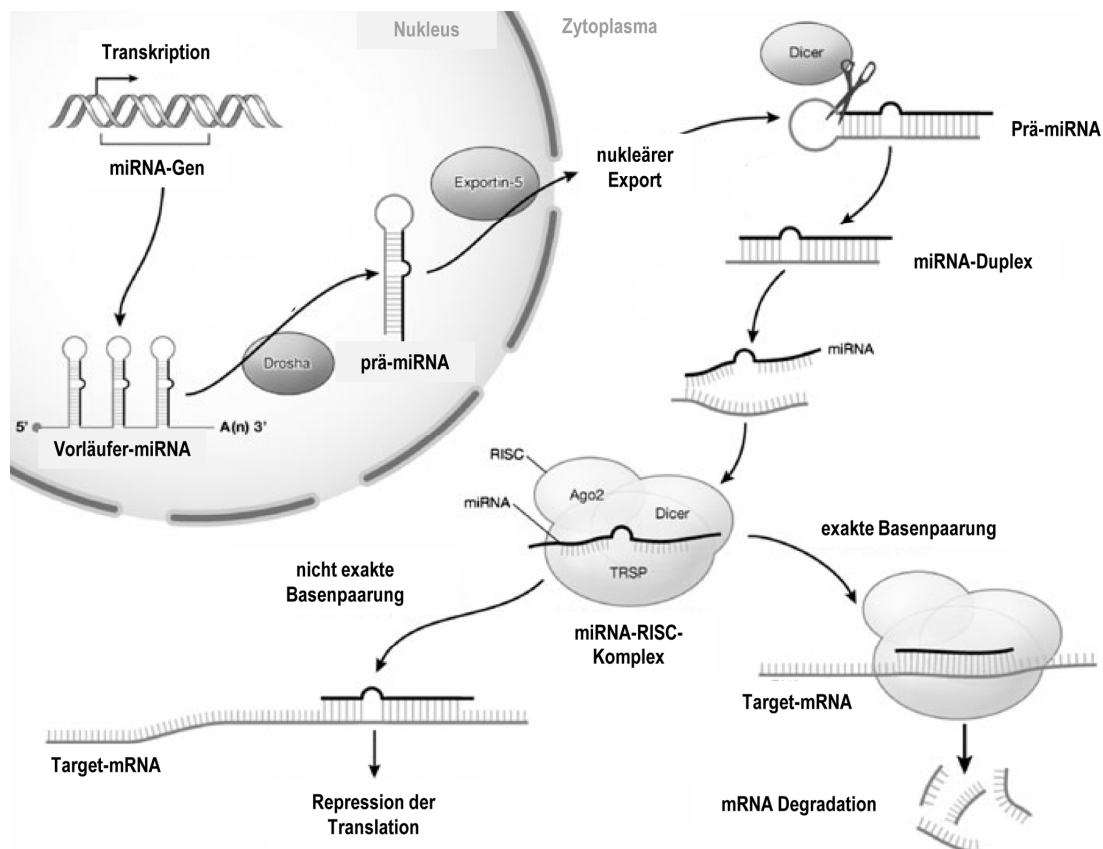


Abb. 8: Biogenese der miRNAs (Davis und Ross, 2008). Die transkribierte Vorläufer-miRNA wird im Nukleus durch Drosha in prä-miRNA gespalten und über Exportin-5 ins Zytoplasma geschleust. Dicer zerschneidet die prä-miRNA in doppelsträngige miRNA (miRNA-Duplex). Diese entwindet sich und wird als mature miRNA in den miRNA-induced silencing complex (miRISC) mit Argonaut 2 (Ago2) und trans-responsiven RNA-bindenden Proteinen (TRSP) eingebaut. Dieser Komplex interagiert mit den Target-mRNAs und führt zur translationalen Repression bzw. Degradation der mRNAs.

Die wichtigsten physiologischen Prozesse in Zellen, wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod, werden auch durch miRNAs reguliert (Taby und Issa, 2010). Es wird angenom-

men, dass 1-4 % aller menschlichen Gene für miRNAs kodieren, die damit die größte Klasse an Genregulatoren darstellen (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

Die genetische Information der miRNAs wird von der RNA Polymerase II in 60-100 bps lange, polyadenylierte Vorläufer-miRNA mit unvollkommener Haarnadelstruktur (*pri-miRNA*) transkribiert. Das primäre Transkript wird noch im Nukleus von dem Protein PASHA gebunden und dem RNA-spaltendem Enzym DROSHA (RNase III) in prä-miRNA (*pre-miRNA*) geschnitten. Diese wird über das membranständige, GTP-abhängige Exportin-5 aus dem Nukleus geschleust. Das RNase III Enzym DICER zerschneidet die prä-miRNA im Zytosol in 17-25 bps lange, doppelsträngige miRNAs (*dsmiRNA*). Der Leitstrang wird nun präferentiell am 5'-Ende der *dsmiRNA* in den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) eingegliedert, der Endonuclease Argonaut 2 und trans-responsive RNA-bindende Proteine (TRSP) enthält. Dieser Komplex interagiert im Folgenden mit korrespondierenden mRNAs, wobei die miRNA an das 3'-untranslatierte Ende der mRNA bindet. Im Falle einer ungenauen Basenpaarung von miRNA und komplementärer mRNA, wird diese entweder gehemmt oder poly-adenyliert und anschließend abgebaut. Eine exakte Basenpaarung mit den sogenannten „Keim-Basen“ 2-8 resultiert hingegen in einer Argonaut-vermittelten Spaltung der Target-mRNA. Die Aktivität der miRNAs wird durch RNA-bindende Proteine reguliert, die zum Beispiel eine Uridylierung am 3'-Ende der Vorläufer RNA induzieren. Auf diese Weise wird die Weiterverarbeitung durch DICER verhindert und die prä-miRNA abgebaut (He und Hannon, 2004; Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

Die erste miRNA *lin-4* wurde von Lee und Kollegen (1993) im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Ebenso wie die als zweite miRNA im Jahr 2000 beschriebene *let-7* kontrolliert sie die Terminierung von Zellproliferation und Differenzierung (Reinhart et al., 2000). Die humanen, homologen miRNAs kontrollieren ebenfalls den Zellzyklus und liegen in verschiedenen Krebsarten überexprimiert vor (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Etwa 50 % der bekannten menschlichen miRNAs befinden sich an instabilen Abschnitten des Genoms und sind assoziiert mit Krebs (*Oncomirs*) (Calin et al., 2004). Von ihnen unterscheidet man miRNAs mit tumor-suppressiven Eigenschaften, wie hsa-miR-15 und hsa-miR-16, die direkte bzw. indirekte Zielmoleküle wie VEGF, Bcl-2 oder c-kit haben (Cimmino et al., 2005; Litz und Krystal, 2006; Suarez et al., 2007).

Eine Fehlregulation der miRNA Expression wurde nicht nur für Krebs, sondern auch für weitere nicht-übertragbare Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit, beschrieben (Leidinger et al., 2010; Keller et al., 2011; Meder et al., 2011). Daher wurden miRNAs, die leicht aus Blutproben zu isolieren sind, auch als Indikatoren (Biomarker) für diese Erkrankungen vorgeschlagen (Fichtlscherer et al., 2011). Lu et al. (2005) zum Beispiel zeigten, dass Krebs unterschiedlicher Genese anhand der miRNA-Profile präziser klassi-

fiziert werden kann als auf Basis des Proteoms. Seit kurzem werden miRNAs auch als prädiktive Marker für das Ansprechen einer Therapie propagiert (Ohuchida et al., 2011; Izzotti et al., 2012). Auch der Einfluß spezieller Diäten mit Methyl-defizienter oder Cholesteroll- und Fett-angereicherter Nahrung auf das miRNA-Profil von Leber und Darm wurde bereits untersucht (Karere et al., 2012; Pogribny et al., 2012).

Weiterhin wurde der Effekt von Curcumin auf die Expression von miRNAs in verschiedenen Tumorzelllinien und (nicht-diätischen) *in vivo* Modellen erforscht (Abb. 9).

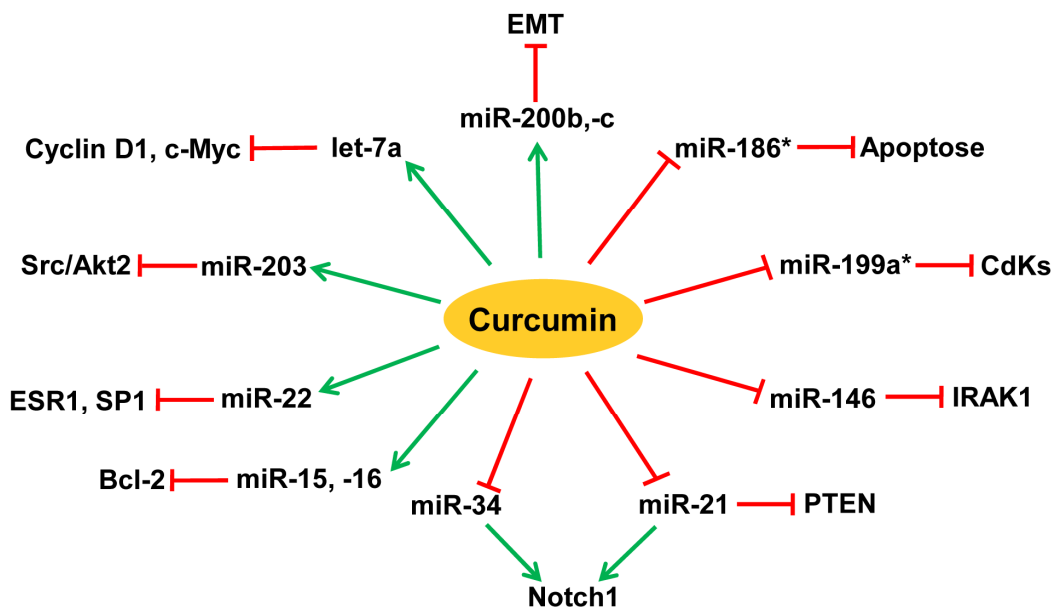


Abb. 9: Wirkung von Curcumin auf die Expression von miRNAs und validierten Targets wie cyclin dependent kinases (CdKs), Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), Phosphatase and Tensin homolog (PTEN), Notch1, Bcl-2, specificity protein 1 (SP1), estrogene receptor 1 (ESR1), Tyrosinkinase Src und Akt2, Cyclin D1, c-Myc und den Prozess der epithelial to mesenchymale transition (EMT).

Es wurde gezeigt, dass verschiedene *Oncomire*, wie miR-21, durch Curcumin herunterreguliert werden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass tumorsuppressive miRNAs wie zum Beispiel let-7a oder die miR-200 Familie durch Curcumin bzw. Curcuminderivate hochreguliert werden (Ali et al., 2010; Bao et al., 2012; Soubani et al., 2012). Sun et al. (2008) untersuchten die Änderungen der miRNA Expression in Pankreaszellen nach Inkubation mit Curcumin. Hierbei wurde unter anderem miR-199a*, welche die Expression Zellzyklus-abhängiger Kinasen inhibiert, herunterreguliert. MiR-22, mit den Targets Transkriptionsfaktor SP1 und Estrogenrezeptor α , wurde signifikant hochreguliert (Sun et al., 2008). Zhang und Kollegen (2010) zeigten, dass Curcumin über die Verminderung der miR-186* Apoptose in Lungenadenokarzinomzellen induziert (Zhang et al., 2010). Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Inhibition entzündlicher Vorgänge durch Curcumin-induzierte miRNAs. So wurde eine Senkung einer miR-146a-bedingten, zentral-

nervösen Gewebsentzündung, wie sie unter anderem bei Morbus Alzheimer vorliegt, in Zellversuchen durch Curcumin erreicht (Cui et al., 2010). Eine Analyse des miRNA-Profiles einer humanen Retinazelllinie belegte eine Reduktion der durch oxidativen Stress induzierten miRNAs nach einer Vorbehandlung mit Curcumin (Howell et al., 2013). Oxidativer Stress spielt ebenfalls in der Entstehung von Hauttumoren eine Rolle (Thangapazham et al., 2013).

Als regulierende Einheiten stellen miRNAs vielversprechende Targets in der Krebstherapie dar. Versuche an Zelllinien belegen, dass Curcumin die Expression von miRNAs in Krebszellen verändert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, wie oral appliziertes Curcumin auf das miRNA-Profil von Tumoren *in vivo* wirkt.

2.4. Eigene Fragestellung

Curcumin wird seit langem in Südostasien konsumiert und findet in der traditionellen Medizin Anwendung (Ammon, 1991). Trotz der schlechten Bioverfügbarkeit (geringe metabolische Stabilität, rasche Ausscheidung) wird der regelmäßige Konsum von Curcumin dort in Zusammenhang mit der niedrigen Inzidenz an Tumorerkrankungen der Brust und des Darms gebracht (Sinha et al., 2003). Obwohl bereits eine Vielzahl an Studien zur anti-kanzerogenen Aktivität von Curcumin durchgeführt wurde, bestehen hinsichtlich der molekularen Wirkmechanismen von diätischem Curcumin etliche ungeklärte Fragen. Für die vorliegende Dissertation ergaben sich daraus folgende Fragestellungen, die in zwei unabhängigen Studienabschnitten bearbeitet wurden:

Studienabschnitt 1: Auswirkungen pyrolytischer Prozesse auf Curcumin

1. Welche Auswirkungen haben pyrolytische Prozesse im Rahmen haushaltsüblichen Kochens auf Curcumin?
2. Verändert die Zugabe von Fetten die Zusammensetzung der Pyrolyseprodukte?
3. Besitzen diese Pyrolyseprodukte ebenfalls eine anti-kanzerogene Aktivität?

Studienabschnitt 2: Effekte von diätischem Curcumin auf Melanome

1. Welche Effekte hat diätisches Curcumin auf das Wachstum und die Blutgefäßneubildung in generierten Melanomen in der Maus?
2. Wird das tumorale miRNA-Profil der Melanome durch diätisches Curcumin nachweislich verändert?
3. Stehen diese Veränderungen im Einklang mit der anti-kanzerogenen Aktivität von Curcumin?

3. Material und Methoden

3.1. Labormaterialien

Die verwendeten Glas- und Plastikwaren wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Frickenhausen), BD Pharmingen (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nümbrecht) aus Deutschland bezogen. Nicht steril verpackte Plastikwaren wurden vor Gebrauch für 30 min bei 120°C und 3,5 bar sterilisiert.

Alle Chemikalien und Reagenzien stammten, sofern nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt, Deutschland) bzw. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Die für die Chromatographien verwendeten Chemikalien wiesen den entsprechenden Reinheitsgrad auf. Alle angesetzten Puffer wurden mit bidestilliertem (bidest.) Wasser (Elix® water, pure, Millipore Corporation, Billerica, USA) angesetzt und steril filtriert.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden murine, amelanotische B78H1 Melanomzellen aus dem *Labor für Immunologie und Biologie von Metastasen*, Institut für Experimentelle Pathologie der Universität Bologna, benutzt. Es handelt sich hierbei um adhärent wachsende Abkömmlinge der murinen B16 Melanomzellen von S. Silagi, die Tap-2 und MHC-I negativ sind (Newcomb et al., 1978; Lollini et al., 1987). Die humanen Melanomzelllinien SK-Mel-28 (ATCC® HTB-72™, *American Type Culture Collection*, Manassas, USA) und MeWo (ATCC® HTB-65™) wurden freundlicherweise vom Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Kultivierung der Zellen

Die in den Experimenten verwendeten Zellen wurden für höchstens fünf Passagen kultiviert und regelmäßig auf Mykoplasmeninfektionen untersucht (VenorGeM PCR-Kit, Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland; verwendet nach Herstellerangaben). Alle Arbeitsschritte der Zellkultivierung wurden steril an einer Sicherheitswerkbank (Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Medien wurden auf 37°C im Wasserbad vortemperiert. Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) unter Standardbedingungen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Zellinkubator (Hera Cell, Heraeus) kultiviert. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, PAA Laboratories, General

Electric Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (Standardqualität, PAA Laboratories), 100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories) und 0,1 mg/ml Streptomycin inkubiert (PAA Laboratories) und alle 2-3 Tage subkonfluent passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS (- Mg^{2+} , - Ca^{2+} nach Dulbecco, PAA Laboratories) gespült und für 3 min bei 37°C mit 5 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories) inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche gelöst und 10 ml DMEM hinzu gegeben, um das Trypsin durch Absättigung mit dem im Kulturmedium enthaltenen FCS zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde nun mit 1.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Z 383 K, Hermle, Gosheim, Deutschland) für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert, 1:4 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Zur Kryokonservierung wurden je 1×10^6 Zellen in 1 ml Kryomedium aufgenommen und in einem speziellen Kryoröhrchen (Greiner Bio-One) graduell über 24 h auf -80°C gekühlt und dauerhaft in Flüssigstickstoff (-196°C) gelagert. Das Kryomedium bestand aus FCS und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Verhältnis 9:1. Das enthaltende DMSO sollte zellschädigende Eiskristallbildung während des Einfrierens verhindern.

Zum Auftauen dauerhaft konservierter Zellkulturen wurden diese aus dem Flüssigstickstoff entnommen und unmittelbar in Kultur gebracht, um zytotoxische Effekte des DMSO zu vermeiden. Hierfür wurde auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium in ein 15 ml-Röhrchen vorgelegt, die kryokonservierten Zellen zu etwa 80 % in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und dann in das Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 1.000 rpm in einer Tischzentrifuge für 3 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wie beschrieben kultiviert.

3.2.3. Isolation primärer humaner peripherer mononukleärer Zellen

Weitere Testreihen mit Curcuminderivaten wurden an humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) durchgeführt. Diese wurden aus dem Vollblut von freiwilligen, gesunden Probanden durch Lyse der Erythrozyten mit einem Erythrozytenlysepuffer gewonnen. Die Erythrozytenlyse wurde einer Aufreinigung auf Basis von Ficollgradienten vorgezogen, um eine Aktivierung der Leukozyten durch das Polymer zu verhindern.

Hierzu wurde das Blut aus den EDTA-Blutentnahmeröhrchen (Sarstedt) in 50 ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt und mit vorgekühltem Erythrozytenlysepuffer im Verhältnis 1:3 für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Zytolyse wurde das gleiche Volumen an gekühltem Medium zur Probe hinzugefügt und für 10 min mit 600 x g bei 4°C abzentrifugiert. Durch die geringe Drehzahl wurden vor allem intakte Zellen angereichert, während Zelltrümmer im Überstand verblieben. Das Zellpellet wurde 2-mal

mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen dann manuell in einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) gezählt.

Erythrozyten-Lysepuffer:

788 mg (10 mM) Tris-HCl

4,41 g (165 mM) NH_4Cl

Chemikalien in 500 ml Aqua bidest.

lösen und bei 4°C aufbewahren.

3.2.4. Zellzählung

Zur Zellzählung wurden 10 μl der Zellsuspension mit 10 μl Trypanblau gemischt (Verdünnungsfaktor: 2) und die vitalen (ungefärbten) Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (Abb. 10). Der Farbstoff Trypanblau penetriert beschädigte Zellmembranen und markiert dadurch nicht-vitale Zellen. Ein zweites 10- μl -Aliquot der Zellsuspension wurde mit Türks Lösung gemischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben, um die Zahl der weißen Blutzellen zu bestimmen. Die in der Türks Lösung enthaltene Essigsäure lysiert die Erythrozyten, so dass diese blau angefärbt werden.

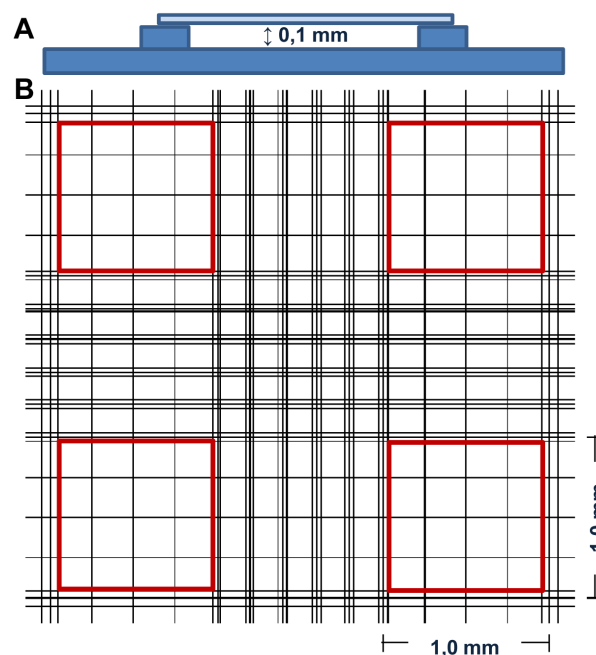


Abb. 10: Neubauer-Zählkammer. **A:** Schematische Darstellung eines Hämozytometers im Querschnitt. **B:** Schematische Darstellung der Zählfläche. Die auszufählenden Quadranten sind rot umrandet (Woermann, 2000).

Zur Berechnung der vitalen PBMCs müssen das Flüssigkeitsvolumen in der Zählkammer und die Verdünnung der Zellen in den Färbelösungen berücksichtigt werden. Die Fläche

eines Eckquadrats beträgt 1 mm². Abgedeckt durch ein Deckglas entsteht eine Höhe von 0,1 mm und damit pro Eckquadrat das Volumen von 0,1 µl (*Abb. 10 A*). Um die Zellzahl für 1 ml zu erhalten, muss daher ein Faktor von 1×10^4 mit eingerechnet werden. Im Allgemeinen werden alle vier Eckquadrate ausgezählt (*Abb. 10*, rot markiert) und der Mittelwert (Mittel) berechnet. Der Verdünnungsfaktor beträgt hier 2, da die Zellsuspension 1:1 mit der Färbelösung verdünnt wurde. Daraus ergibt sich folgende Gleichung zu Berechnung der vitalen Leukozyten in 1 ml:

Vitale Zellen (Trypanblau): ungefärbte Zellen_{Mittel} $\times 2 \times 10^4$

Gesamtzellzahl (Trypanblau): (ungefärbte_{Mittel} + gefärbte Zellen_{Mittel}) $\times 2 \times 10^4$

Leukozyten (Türks Lösung): ungefärbte Zellen_{Mittel} $\times 2 \times 10^4$

> Vitale Leukozyten (1 ml): Vitale Zellen \times Leukozyten / Gesamtzellzahl

3.2.5. WST-1-Assay

Der Einfluss der Curcuminderivate auf die Zellviabilität wurde mit einem WST-1-Assay (*water soluble tetrazolium, WST-1*) untersucht. Dieser Assay beruht auf der extrazellulären Umsetzung von Tetrazolium zu Formazan, einem rötlichen Tetrazoliumsalz. Die Aufspaltung von Tetrazolium geschieht durch die Aufnahme von Elektronen aus dem Elektronentransport über die intakte Zellmembran (Berridge et al., 2005). Die entstehende Rotfärbung kann photometrisch quantifiziert werden.

Der WST-1-Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Hierfür wurden 5×10^3 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und entweder mit 0,1 % DMSO (Vehikel) oder seriellen Verdünnungen der Curcuminderivate inkubiert. Deketencurcumin, pyrolysiertes Curcumin und Curcumin wurden in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM und 100 µM getestet. Nach 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen wurden 10 µl WST-Reagenz pro 100 µl Medium in jedes Well pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm in einem Mikroplatten-Photometer (PHOMo, Autobio Labtech Instruments, Zhengzhou City, China) gemessen. Alle Werte wurden gegen die Absorption von zellfreiem Medium, versetzt mit Curcuminderivaten in der jeweiligen Konzentration, korrigiert. Die Versuche wurden in Vierfach-Ansätzen durchgeführt.

3.2.6. Durchflußzytometrische Analysen

Durchflußzytometrische Analysen erlauben eine spezifische Untersuchung extra- und intrazellulärer Proteine sowie der Größe und Granularität einzelner Zellen im großen Maß-

stab. Für die Messung wird eine bestimmte Anzahl Zellen in einer Suspension durch eine Mikrokapillare aufgesogen, in einem Flüssigkeitsfilm vereinzelt und mit einem Laser angestrahlt (Abb. 11). Der größte Teil des Lichts wird in Vorwärtsrichtung gestreut und als Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet. Diese Streuung ist abhängig von der Größe der Zellen. Das Licht, das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut wird, bezeichnet man als Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) (Abb. 11). Dieses dient als Maß für die Granularität der Zellen.

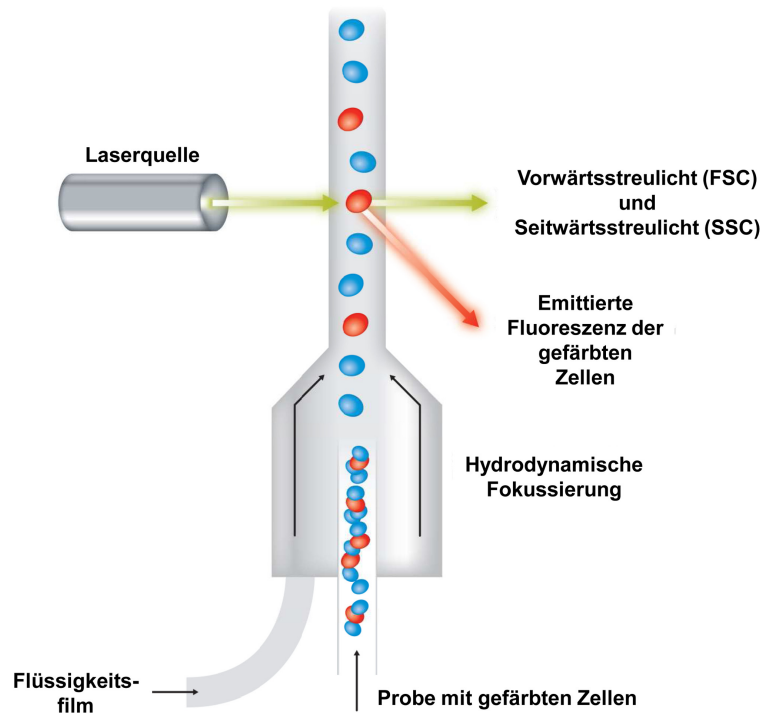


Abb. 11: Schematische Darstellung zur Durchflußzytometrie (Abcam, 2010).

Eine spezifische Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern dient zum Nachweis bestimmter Proteine. Anhand der detektierten Intensität ist eine Quantifizierung der Proteinexpression möglich. Durch die Anregungsstrahlung werden Elektronen in den Fluorochromen auf höhere Energieniveaus gehoben. Beim Rückfall dieser Elektronen auf das Grundniveau wird die freiwerdende Energie als langwelligeres Licht emittiert, die als in diesem Fall als Fluoreszenz bezeichnet wird. Aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten und Streuungsphänomene können Zellpopulationen mit bestimmten Eigenschaften unterschieden und dann quantifiziert werden.

Alle durchflußzytometrischen Analysen wurden am FACSCanto™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) durchgeführt und mit Hilfe der BD FACSDiva™ software (Becton, Dickinson and Company) und WinMDI Version 2.8 freeware (Scripps Institute, La Jolla, USA) ausgewertet.

3.2.6.1. Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der Curcumin-derivate gegen primäre humane PBMCs und murine B78H1 Melanomzellen wurde mit einer Annexin- und Propidiumiodid (PI)-Doppelfärbung im Durchflußzytometer bestimmt. Das fluoreszierende PI kann bei einer durchlässigen Zellmembran, wie sie bei nekrotischen Zellen vorliegt, in die DNA interkalieren. Im frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin von der inneren Membranseite zur Außenseite transloziert, auf diese Weise kann Annexin extrazellulär daran binden. Ist die Apoptose weiter fortgeschritten (*späte Apoptose*), kann auch hier die DNA mit PI angefärbt werden, so dass doppelt-gefärbte bzw. doppelt-positive Zellen vorliegen. Der verwendete Antikörper gegen Annexin war mit Allophycocyanin (APC) gekoppelt. Dieser Farbstoff wird aus Cyanobakterien isoliert und von einem Helium-Neon-Laser bei 633 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz bei maximal 657 nm überlappt nicht mit der Curcumin-emittierten Strahlung bei 250-520 nm. Da diese Färbungen an unfixierten Zellen durchgeführt wurden und PI zytotoxisch ist, muss die durchflußzytometrische Analyse umgehend erfolgen.

Für den Nachweis der apoptotischen Zellen wurden je 1×10^6 Zellen pro Well in eine 12-Well-Platte ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Danach wurden die Zellen für 24 h entweder mit 0,1 % DMSO (Vehikel) oder mit den Curcumin-derivaten in Konzentrationen von 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M und 100 μ M unter Standardbedingungen inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mit Trypsin geerntet, zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und für 15 min mit APC-markiertem Annexin (Immunotools, Friesoythe, Deutschland; 1:24 in 60 μ l Annexin-Bindpuffer) lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann in 140 μ l PBS aufgenommen, in 5 ml-Rundboden-Polystyren-Röhrchen (Becton, Dickinson and Company) überführt und unmittelbar vor der FACS-Messung mit 2 μ l einer Stock-Lösung PI (1 mg/ml) versetzt. Die Annexin-positiven Zellen wurden über den APC-Kanal und die PI-positiven Zellen über den PerCP-Cy5-Kanal detektiert. Die ungefärbten Zellen wurden als „vital“ definiert. Die Zellen, die ausschließlich PI aufnahmen, als „nekrotisch“. Doppelt-positive Zellen wurden als „spät-apoptotisch“ definiert. Zellen, die ausschließlich Annexin V positiv waren, befanden sich in einem „frühen apoptotischen“ Stadium. Für die Auswertungen wurde die Gesamtzahl an „apoptotischen“ Zellen in einer Probe berechnet, die sich aus den beiden letztgenannten Gruppen zusammensetzte. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt, wobei jede Probe in Duplikaten angesetzt wurde.

Annexin-Bindepuffer:

50 mM Hepes

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

Die Chemikalien in 60 ml Aqua bidest. lösen,
einen pH-Wert von 7.4 mit NaOH einstellen und
auf 100 ml auffüllen

3.2.6.2. Bestimmung der Zellzyklusphasen

Um die Effekte der Curcuminderivate auf den Zellzyklus von B78H1 Melanomzellen zu bestimmen, wurden die Zellen wie oben beschrieben für 24 h mit 20 µM Curcumin, pyrolysiertem Curcumin, Deketencurcumin oder 0,1% DMSO (Vehikel) inkubiert bzw. nicht stimuliert (Negativkontrolle). Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Überstand komplett entfernt und die Zellen in 200 µl 0,9 % NaCl resuspendiert. In neue 2-ml-Reaktionsgefäße wurden je 1.800 µl 100 % Methanol vorgelegt. Die Zellsuspension wurde mit einer Insulinspritze aufgenommen und durch eine 25 G Nadel in das Methanol gespritzt, um die Zellen zu vereinzeln. Die Suspension wurde dann für mindestens 24 h bei -20°C zur vollständigen Fixierung gelagert.

Danach wurden die Zellen kurz bei Raumtemperatur aufgetaut und für 1 min mit 12.000 rpm (EBA1212, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen, um die Puffersalze zu entfernen. Die Proben wurden für 2 min mit 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellpellets wurden nun in 250 µl PBS mit RNase A (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland; 1:400 der 10 mg/ml Stocklösung) resuspendiert. Dann in 5 ml-Rundboden-Polystyren-Röhrchen überführt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Röhrchen wurde 250 µl PBS mit PI (1:100, 1 mg/ml Stocklösung) hinzugegeben und die Suspension für weitere 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben im FACSCanto™ gemessen, wobei die PI-gefärbten Zellen im PerCP-Cy5-Kanal detektiert wurden. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei jede Probe in Duplikaten gemessen wurde.

3.2.7. Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Curcuminderivate besitzen je nach Anregungswellenlänge eine Eigenfluoreszenz im Bereich von 250-520 nm. Dieser Umstand wurde zur qualitativen Analyse der Absorption der Curcuminderivate durch B78H1 Zellen genutzt.

Hierfür wurden 1×10^5 B78H1 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Dann wurden die Zellen entweder mit 0,1% DMSO (Vehikel) bzw. 20 μ M Curcumin, pyrolysiertem Curcumin oder Deketencurcumin versetzt und nach 1 h und 24 h Inkubation bei 37°C Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop BIOZERO-8000 (Keyence Corporation, Itasca, USA) gemacht. Die Autofluoreszenz der absorbierten Curcuminderivate konnte im GFP-Fluoreszenzkanal detektiert werden. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Isolation der RNA aus Tumorproben

Zur Untersuchung der Effekte von diätischem Curcumin auf das tumorale miRNA-Netzwerk wurden B78H1 Zellen in die Flanken von Mäusen injiziert, die entweder Kontroll- oder Curcumin-haltiges Futter zu sich nahmen (s. 3.5.-3.9., 3.11.). Nach 28 Tagen wurden die Tierversuche beendet und die Flankentumoren entnommen. Für Folgeanalysen wurden diese in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt (s. 3.9.). Aus diesen Tumorproben wurde die gesamte RNA inklusive der miRNA isoliert. Die nachfolgend beschriebenen miRNA-Analysen wurden gemeinsam mit Dr. Petra Leidinger (Microarray-Analysen) und Dr. Christina Backes (Bioinformatische Analysen) der AG Meese, Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, durchgeführt.

Die Isolation der miRNAs erfolgte mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben, alle verwendeten Puffer waren hier enthalten. Die verwendeten Plastikwaren wurden vor der Benutzung mit Chloroform behandelt und autoklaviert, um RNA-spaltende Enzyme (RNAsen) zu inhibieren. Jeweils 50 μ g Tumorgewebe wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen gegeben, mit 700 μ l *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen N.V.) versetzt und mit Einmal-Pistillen homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 140 μ l Chloroform hinzugefügt und die Probe für 15 s kräftig geschüttelt. Die Proben wurden erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend für 15 min mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere wässrige Phase (etwa 400 μ l) wurde danach in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem 1,5-fachen Volumen (etwa 600 μ l) an 100 % Ethanol durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt, um die RNA zu fällen. Die Interphase und organische Phase wurden zur späteren Aufreinigung der Proteine bei -80°C eingefroren. Ein Volumen von 600 μ l des Gemisches wurde auf RNeasy Mini Säulen in 2-ml-Reaktionsgefäßen überführt und bei 12.000 rpm für 30 s bei Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge Sigma 1-15, B. Braun Melsungen AG,

Melsungen, Deutschland). Der Durchfluss wurde danach verworfen. Die restlichen Proben wurden auf die entsprechenden Säulen pipettiert und die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurden die Proben mit je 700 µl RWT Puffer gewaschen und der Durchfluss verworfen. Der nächste Waschschrift erfolgte mit 500 µl RPE Puffer. Danach wurden die Säulen ein weiteres Mal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und bei 12.000 rpm für 2 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nun wurden die Säulen in neue 2-ml-Reaktionsgefäße gestellt und trocken zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Die Säulen wurden erneut in saubere 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt, mit 50 µl RNase-freiem Wasser versetzt und für 1 min mit 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die RNA von den Säulen zu eluieren. Die Proben wurden 1:100 mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O verdünnt und die RNA Konzentrationen im NanoDrop 1000 Photospektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Um die Qualität der aufgereinigten RNA zu bestimmen, wurden die Proben 1:500 in DEPC-H₂O verdünnt und je 1 µl pro Probe im Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) auf RNA Biochips (RNA 6000 *Nano* Kit, Agilent Technologies) analysiert. Hierfür wurde die RNA im Vorfeld für 2 min bei 70°C denaturiert, mit je 5 µl des Fluoreszenzfarbstoff-versetzten Probenpuffers nach Herstellerangaben verdünnt und auf dem Biochip elektrophoretisch aufgetrennt. Die optischen Signale, die das Analysegerät während der Elektrophorese erfasst, werden graphisch als Banden wiedergegeben.

DEPC-Wasser:

0,1 % Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest.
lösen, für 1 h bei RT rühren. Danach autoklavieren und über Nacht abkühlen lassen

3.3.2. Hochdurchsatz-Analyse des miRNA Profils

Zur Hochdurchsatz-Analyse des tumoralen miRNA Profils wurde ein Array-System der Firma Agilent Technologies verwendet. Die Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zu diesem Zweck wurden jeweils 2 µl jeder RNA-Probe (50 ng/µl) auf die Matrix eines *mouse Sure Print G3 miRNA V17.0 microarray chip* (8x60K; # G4859B, Agilent Technologies) hybridisiert (Abb. 12). Auf jedem *high-definition array* waren 1079 murinen miRNAs in je 40 Replikate gespottet, die in der Sanger miRBase 17.0 Datenbank aufgeführt sind (<http://mirdb.org/miRDB/>) (Griffiths-Jones et al., 2006).

Die Markierung der Proben erfolgte durch eine Ligation von Cyanine-3pCp an das 3'-Ende der RNA. Zu diesem Zweck wurden die Proben zuerst für 30 min bei 37°C mit einer Phosphatase inkubiert. Danach wurden die dephosphorelierte RNA mit DMSO (100 %) versetzt und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Proben wurden unmittelbar in

ein Eiswasserbad überführt, um die Renaturierung der RNA zu verhindern. Nun erfolgte mit Hilfe einer T4 RNA-Ligase in einem entsprechenden Puffer die Ligation von Cyanine-3pCp an die RNA. Hierfür wurden die Proben für 2 h bei 16°C in einem Kühlblock inkubiert. Die Proben wurden danach für circa 90 min bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach erfolgte eine Rehydrierung mit 18 µl RNase-freiem Wasser. Die Proben wurden mit einem Hybridisierungspuffer und einem Blocking Agens versetzt, für 5 min bei 100°C inkubiert und sofort in ein Eiswasserbad überführt. Um die RNA-Proben auf den Microarray-Chip zu hybridisieren, wurden diese in eine abgedichtete Platte mit vorgeformten Feldern pipettiert. Der Chip wurde mit der Array-Seite auf die Platte gelegt und fest mit einer Klammer verschlossen. Die Hybridisierung der Cyanine-3pCp-markierten Proben auf den Chip erfolgte über 20 h bei 55°C unter konstanter Rotation bei 20 rpm. Danach wurden die Chips nach Herstellerangaben gewaschen und im *3 Micron double path mode* in einem *high resolution microarray scanner* (Agilent Technologies) analysiert. Hierbei wurde die Signal-Intensität der hybridisierten miRNAs gescannt (Scan Control 8.5.1 software, Agilent Technologies) und als Bild dargestellt (Abb. 12).

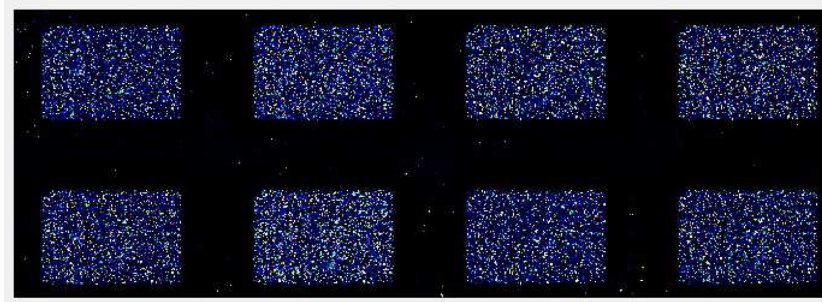


Abb. 12: Bild eines gescannten Micro-Array-Chip.

Mittels der *Feature Extraction software* wurden die Bildpixel in Zahlenwerte übersetzt, die den Expressionswerten der miRNAs entsprachen. Diese Rohdaten (*raw data files*) wurden gegen den Hintergrund korrigiert (*gTotalProbeSignal*) und der Durchschnittswert aus den 40 Replikaten jeder miRNA errechnet. Die Normalisierung der Quantile über alle Datensätze hinweg erfolgte mit der statistischen Sprache *R* (*preprocessCore package*; www.r-project.org). Es folgte eine \log_2 Transformation der Daten, die bei der *NCBI's Gene Expression Omnibus* Datenbank unter der *GEO Series accession number* GSE47211 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47211>) zu finden sind (s. *Anhang, Tab. 11*) (Edgar et al., 2002). Nachfolgend wurde eine komplette hierarchische Cluster-Analyse basierend auf euklidischer Distanzberechnung durchgeführt. Als Grundlage hierfür wurden die 50 miRNAs herangezogen, die unabhängig voneinander über alle Proben hinweg die größte Varianz in der Expression zeigten. Um signifikante Änderungen im

Expressionsniveau der miRNAs zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe zu finden, wurde der unabhängige, zwei-seitige Student's *t*-Test angewandt. Die errechneten *P*-Werte wurden mit der *false discovery rate* (FDR) für wiederholtes Testen korrigiert (Benjamini und Hochberg, 1995). Deregulierte miRNAs mit einem korrigierten *P*-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.3.3. *In silico* Analyse der zellulären Signalwege

Für die *in silico* Datenanalyse wurden annotierte, putative Ziele muriner miRNAs von der aktuellen miRDB Datenbank bezogen. Hierbei wurden zelluläre Signalwege, die potentiell durch Curcumin-modulierte miRNAs reguliert werden, durch eine Überrepräsentationsanalyse (*over-representation analysis*, ORA) identifiziert. Diese Analyse wurde mit Hilfe der Web-basierten Applikation *GeneTrail* (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/>) durchgeführt (Backes et al., 2007). Als Testsets wurden einerseits die durch Curcumin hochregulierten und andererseits die durch Curcumin herunterregulierten miRNAs herangezogen. Als Referenzset dienten alle miRNAs, die auf dem Array gespottet waren. *GeneTrail* führte eine Suche in der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) nach einer Anreicherung putativer miRNA Targets in zellulären Signalwegen durch (Tanabe und Kanehisa, 2012). Die *P*-Werte für die so identifizierten KEGG Signalwege wurden nach der FDR angepasst und für *P*<0,05 als statistisch signifikant anerkannt.

3.3.4. Quantitative Real Time-PCR von miRNAs

3.3.4.1. Reverse Transkription

Die RNA-Proben aus den Tumoren wurden nach Herstellerangaben mit dem miScript II RT Kit (Qiagen N.V.) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden pro Probe 200 ng Gesamt-RNA, zusammen mit 5x *HiSpec* Puffer, 10x *miScript* Nukleinsäuremix, *miScriptReverse Transkriptasemix* und RNase-freiem Wasser eingesetzt (*Tab. 1*). Die Proben wurden sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, kurz abzentrifugiert und bis zur Transkriptionsreaktion auf Eis gelagert. Bei dem miScript II RT Kit von Qiagen basiert die reverse Transkription speziell der reifen miRNAs auf deren spezifische Polyadenylierung. Natürlicherweise liegen reife miRNAs nicht polyadenyliert vor. In einem ersten Reaktionsschritt wurden die vorhandenen miRNAs mit Hilfe einer poly(A)Polymerase polyadenyliert und im Folgeschritt unter Nutzung spezieller oligo-dT Primern reverse transkribiert (*Tab. 1*). Diese Schritte liefen parallel zueinander im selben Reaktionsgefäß ab. Die oligo-dT Primer zeichneten sich durch einen degenerierten Anker am 3'-Ende sowie einer universellen Marker-Sequenz am 5'-Ende aus, welche die Amplifikation der cDNA während der RT-PCR erlaubte. So konnte sichergestellt werden, dass

keine genomische DNA amplifiziert wurde. Für die Transkriptionsreaktion wurden die Proben für 60 min bei 37°C inkubiert. Dann folgte eine Inkubation bei 95°C für 5 min, um die Transkriptionsreagenzien zu inaktivieren (Tab. 2). Die Proben wurden über Nacht bei -20°C eingefroren.

Tab. 1: Master-Mix zur reversen Transkription (nach Herstellerangaben)

Reverse Transkription-Mix	1 Reaktion
RNase-freies Wasser ¹	x µl
5x HiSpec Puffer	2,0 µl
10x miScriptNukleinsäuremix	1,0 µl
miScript Reverse Transkriptasemix	1,0 µl
¹ RNase-freies Wasser wird je nach Konzentration der Template-RNA hinzugefügt. Das Gesamtvolumen pro Reaktion beträgt 10 µl.	

Tab. 2: Protokoll zur reversen Transkription (nach Herstellerangaben)

Protokoll	Temperatur [°C]	Dauer
1 Zyklus	37	60 min
1 Zyklus	95	5 min

3.3.4.2. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurden je 100 ng Template-cDNA pro Probe 1:10 mit Wasser verdünnt und 1 µl (2 ng/µl) für die Reaktion eingesetzt. Hierfür wurden je 9 µl an *Master Mix* (Tab. 3) pro Well in eine 96-well Platte (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0,1 ml, Life Technologies, Carlsbad, USA) vorgelegt und dann die Probe hinzu pipettiert. Die Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge erfolgte durch den Einbau von SYBR Green (Abb. 13 A). Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet unspezifisch an Nukleinsäuren, wird durch eine Wellenlänge von 494 nm angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von 521 nm. Die nukleäre RNU6B diente bei der qRT-PCR als endogene Kontrolle. Für den miScript Primer Assay wurden im Vorfeld jeweils die Primer gegen mmu-miR-205-5p, mmu-miR-205-3p, mmu-miR-142-5p, mmu-miR-130b-3p und RNU6B mit 550 µl TE-Puffer (Tris-EDTA buffer solution, pH 8.0, Sigma-Aldrich) rekonstituiert.

Die Platte wurde nun sorgfältig mit einer Klebefolie (MicroAmp Optical Adhesive Film, Life Technologies) verschlossen und für 1 min mit 1.000 x g zentrifugiert. Die Proben wurden im StepOnePlus™ RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit miScript primer assays (Qiagen) analysiert. Die PCR startete mit einem initialen Aktivierungsschritt für 15 min bei 96°C, um die HotStarTaqDNA-Polymerase zu aktivieren. Es folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 94°C zur Denaturierung der DNA, 30 s bei 55°C, um das Anlagern der Primer an die DNA-Stränge zu ermöglichen sowie 30 s bei 70°C zur Extension der cDNA (Tab. 4). Mit zunehmender Zahl an Fluoreszenz-markierten cDNA-Strä-

ngen nahm die Intensität zu. Diese wurde detektiert und als Amplifikationsplot aufgetragen. Bei einer linearen Achseneinteilung stellt sich dieser typischerweise sigmoidal dar (Abb. 13 B).

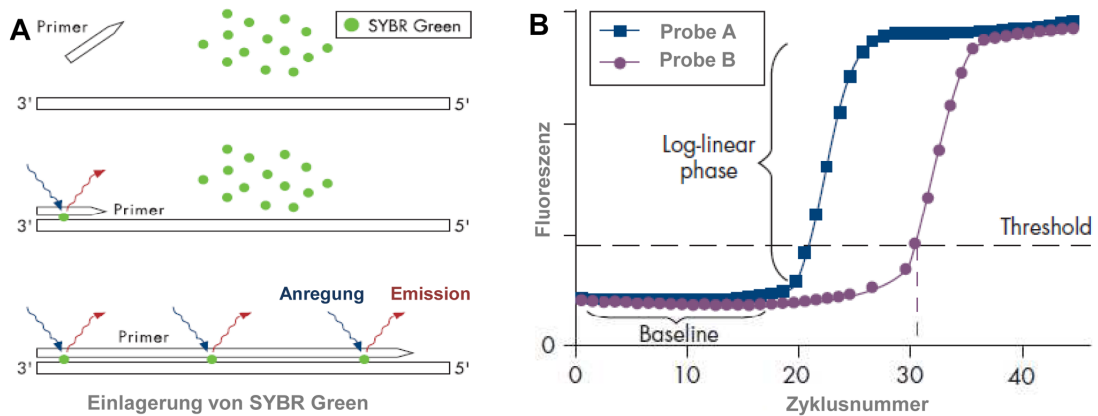


Abb. 13. qRT-PCR mit SYBR Green. **A:** Schematische Darstellung des Einbaus von SYBR Green in die cDNA. Es kommt zur Akkumulation des Fluoreszenzsignals. **B:** Die Fluoreszenzintensität steigt mit der Anzahl der PCR-Produkte. Anhand der Zahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, um die log-lineare-Phase der Amplifikation zu erreichen, kann die relative Menge an Ausgangsmaterial bestimmt werden (Applied Biosystems).

Für jede Probe wurde der Zyklus bestimmt, in dem die Amplifikationsphase (*log phase*) begann (*thresholdcycle*, C_t). Zur relativen Quantifizierung des miRNA-Gehaltes wurde zuerst C_t der internen Kontrolle vom C_t der Probe subtrahiert. Man erhält den ΔC_t -Wert für jede Probe. Zum Vergleich zwischen Curcumin- und Kontrolltieren wurden die Mittelwerte der ΔC_t -Werte für beide Gruppen berechnet. Dann wurde der ΔC_t Mittel Kontrollen von ΔC_t Mittel Curcumin subtrahiert. Man erhielt $\Delta\Delta C_t$, der sich umgekehrt proportional zur enthaltenen Menge an miRNA verhielt.

$$\Delta C_t: C_t \text{ Probe} - C_t \text{ interne Kontrolle}$$

$$\Delta\Delta C_t: \Delta C_t \text{ Mittel Curcumin} - \Delta C_t \text{ Mittel Kontrollen}$$

Tab 3: Master-Mix zur qRT-PCR (nach Herstellerangaben).

MasterMix	1 Reaktion
Wasser	2,0 µl
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix ¹	5,0 µl
10x miScript universal Primer	1,0 µl
10x miScript Primer Assay	1,0 µl

¹2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP Mix inkl. dUTP, SYBR Green I, ROX™ Referenzfärbung, 5 mM MgCl₂

Tab 4: Protokoll zur qRT-PCR (nach Herstellerangaben)

qRT-PCR-Protokoll	Temperatur [°C]	Dauer
1 Zyklus	96	15 min
40 Zyklen	94	15 s
	55	30 s
	70	30 s
Halten bei	8	

3.4. Chemische und proteinbiochemische Analysen

3.4.1. Curcuminpyrolyse

Die Analyse des pyrolysierten Curcumins durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC), Kernspinresonanzuntersuchungen und die präparative HPLC wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Boettcher aus dem Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes, durchgeführt. Die Aufbereitung der Proben, die Durchführung der Pyrolyse sowie die Auswertung der Daten erfolgte gemeinsam.

3.4.1.1. Pyrolyse

Die Pyrolyse ist definiert als eine thermische Zersetzung von Stoffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Produkte bei der Pyrolyse von Curcumin entstehen und was die Zugabe von unterschiedlichen Fetten an der Produkt-Zusammensetzung ändert. In den Versuchen wurde Curcumin entweder mit oder ohne Zugabe von Olivenöl bzw. Kokosfett erhitzt. Für eine standardisierte Pyrolyse wurden je 5,0 mg Curcumin (Sigma-Aldrich) in ein kleines Glasgefäß (d: 20 mm, h: 40 mm) gefüllt und entweder mit oder ohne 50 mg des jeweiligen Fettes durchgeführt. Die Pyrolyse von Curcumin fand für 20 min bei 250°C auf einer Heizplatte in einem nicht-hermetisch verschlossenen Gefäß statt (aerobe Bedingungen). Als Kontrollen dienten unpyrolysierte Proben der gleichen Zusammensetzung. Auf diese Weise wurden die Proben in drei voneinander unabhängigen Versuchen, in Duplikaten, generiert und mittels HPLC analysiert.

3.4.1.2. Analytische HPLC

Die HPLC erlaubt die chromatographische Auftrennung eines Substanzgemisches basierend auf der Polarität der Inhaltstoffe. Hierbei wird ein zu untersuchendes Substanzgemisch auf eine Trennsäule (*stationäre Phase*) gegeben. Nun wird ein Laufmittel (*mobile Phase*) hinzugegeben, dessen Polarität kontinuierlich abnimmt. Je nach Polarität der einzelnen Substanzen des Gemisches werden diese zeitlich versetzt von der Säule eluiert (*Retentionszeit*). Ein angeschlossenes Massenspektrometer, in dem die Proben aufkon-

zentriert und mittels Elektrospray-Ionisation ionisiert werden, dient zur Bestimmung der Massen der aufgetrennten Substanzen.

Vor der HPLC-Analyse ließ man die Pyrolyseprodukte auf Raumtemperatur abkühlen. Dann wurden diese in 1 ml Aceton gelöst und in HPLC-Gefäße überführt. Die Quantifizierung der Produkte wurde mit dem ThermoFisher SpectraSystem HPLC-UV-MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt, welches mit einer Entgasungsvorrichtung, einer quaternären Pumpe, einem automatischen Probengeber, einem Detektor für mehrere Wellenlängen sowie einem MSQ ESI Massenspektrometer ausgestattet war (Technische Details: *positive mode*, *source temperature*: 350°C, *spray voltage*: 3,0 kV, *nitrogen sheath gas pressure*: $4,0 \times 10^5$ Pa, *sheath gas flow*: 58 ml/min, *auxiliary gas flow*: 29 ml/min). Der automatische Probengeber injizierte jeweils 25 µl jeder Probe in die stationäre Phase (RP C18 Nucleodur 100-5 (125 mm x 3 mm) Säule der Macherey-Nagel GmbH). Als Laufmittel dienten destilliertes Wasser und Acetonitril mit 0,1% Trifluorsäure (TFA) (v/v). Die Flußrate betrug 800 µl/min. Die Auftrennung der Proben (von hydrophil zu hydrophob) wurde über die graduelle Mischung der Laufmittel erreicht. Der Anteil von Acetonitril im Wasser wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 16 min von 5 % auf 100 % erhöht, 2 min gehalten und dann wieder auf 5 % reduziert. Je hydrophober ein Produkt war, umso später wurde es durch das Laufmittel wieder von der Säule gelöst. Hydrophilere Produkte wiesen also kürzere Retentionszeiten auf.

Die Detektion der Pyrolyseprodukte erfolgte bei den Wellenlängen 254 nm zum Nachweis der Curcuminderivate und 205 nm zur Darstellung der Fettsäuren. Analysiert wurde die maximale Höhe ($y_{(\text{peak})}$) der HPLC-Spitzen, welche zu den unterschiedlichen Retentionszeiten detektiert wurden. Aufgrund der großen Menge an Nebenprodukten und dem daraus resultierenden hohen Hintergrundrauschen (*baseline*) ließ sich keine absolute Quantifizierung durchführen. Auf Basis von $y_{(\text{peak})}$ wurden jedoch die Verhältnisse der einzelnen Produkte zum nicht umgesetzten Edukt in jeder Probe berechnet, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen.

3.4.1.3. Präperative HPLC von Deketencurcumin

Nach der Analyse der pyrolytischen Produkte sollte die biologische Aktivität von Deketencurcumin näher charakterisiert werden. Für diesen Zweck musste das Produkt in ausreichender Menge aus pyrolysiertem Curcumin (Sabinsa Cooperation, East Windsor, USA) aufgereinigt werden. Um genügend Ausgangsmaterial zu gewinnen, wurden 100 mg Curcumin für 120 min in einer Kristallisationsschale bei 250°C pyrolysiert. Die Isolation von Deketencurcumin aus der Gesamtheit der Pyrolyseprodukte wurde mit einem *Waters Autopurification HPLC-DAD-MS* Chromatographen (Waters Cooperation, Milford, USA) in 30 einzelnen Isolationsläufen mit je 3-4 mg der pyrolysierten Probe gelöst in 1 ml Aceton durchgeführt. Als feste Phase diente ein C-18 Waters X-Bridge OBD Säule (19 mm x 150

mm x 5 µm, Waters Cooperation). Das Laufmittel bestand aus destilliertem Wasser und Methanol mit 0,1 % TFA (v/v). Die Flußrate betrug 20 ml/min und die Konzentration von Methanol (in Wasser) wurde über einen Zeitraum von 7 min von 10 % auf 95 % erhöht, für 1 min gehalten und dann innerhalb 1 min wieder auf 10 % reduziert. Der Fraktionensammler wurde über das integrierte Massenspektrometer (*SIM mode*) angesteuert, um ausschließlich die Fraktion mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis von m/z: 327 (Weite: 1,0 m/z) zu sammeln.

3.4.2. Proteinbiochemie

3.4.2.1. Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionierung von Zelllysaten

Um die Effekte von Curcuminderivaten auf den Transkriptionsfaktor NF-κB (p65) in B78H1 Tumorzellen zu untersuchen, wurde eine Fraktionierung der Zelllysate durchgeführt, da die nukleäre Lokalisation von NF-κB maßgeblich für die Aktivität des Transkriptionsfaktors ist. Hierfür wurden die getesteten Zellen mittels unterschiedlicher Lysepuffer in zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen aufgeschlossen, wobei zuerst nur die Zellmembran mit hypotonischem Puffer A und in einem zweiten Schritt die Zellkernmembran mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulphate*, SDS) aufgeschlossen wurde. Die Effizienz der Fraktionierung wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft, wobei der *acetyltransferase p300/CBP-associated factor* (PCAF) als nukleärer, und α-Tubulin als zytoplasmatischer Marker dienten.

Für die Western Blot-Analysen wurden pro Versuchsansatz 2×10^6 Zellen eingesetzt. Nach der Inkubation mit 20 µM Deketencurcumin, pyrolysiertem Curcumin, Curcumin oder 0,1% DMSO (Vehikel) für 24 h und einer Stimulation mit TNF-α (10 ng/ml) für 6 h, wurden die Zellen mit Trypsin geerntet, einmal mit TBS gewaschen und mit 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und etwa ein Drittel jeder Probe wurde als Gesamtzelllysat aufgearbeitet. Dafür wurde die Probe mit 100 µl auf 4°C vorgekühltem hypotonischem Puffer A mit 1 % SDS und 1,2 % Nonidet-P40 gemischt, für 15 min auf Eis inkubiert und nachfolgend mit den nukleären Fraktionen zusammen weiterbearbeitet (s. unten).

Zur Aufarbeitung der zytoplasmatischen Proteine wurden die restlichen zwei Drittel der Proben mit 400 µl vorgekühltem hypotonischem Puffer A gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dazu wurden nun 25 µl 10 % Nonidet-P40 gegeben und alles für 10 s geschüttelt. Danach wurden die Proben für 30 s mit 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand als zytoplasmatische Fraktionen gesammelt.

Die Pellets wurden mit je 1 ml hypotonischem Puffer A gewaschen und mit 100 µl hypotonischem Puffer A mit 1 % SDS (w / v) für 10 min bei 98°C unter Schütteln aufge-

kocht. Die Probe wurde dreimal mit einer Insulinspritze (25 G Nadel) aufgezogen, um die Zellkerne aufzuschließen und dann für 10 min mit 14.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurde als nukleäre Fraktionen gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und 7,5 µg Protein von jeder Probe im Western Blot analysiert.

Hypotonischer Puffer A:

238 mg Hepes (pH7,9)

74, 5 mg KCl

Protease Inhibitor 1:25 (Roche complete EDTA-free, Roche, Basel, Schweiz)

Die Chemikalien in 50 ml Aqua bidest. lösen,
dann auf 100 ml auffüllen

TBS-T-Puffer (pH 7,6):

1,40 g Tris

6,05 g Tris HCl

8,78 g NaCl

Die Chemikalien in 500 ml Aqua bidest. lösen,
dann auf 1000 ml auffüllen

3.4.2.2. Isolation von Proteinen aus Tumorgewebe

Zur Überprüfung der Expression putativer Targetproteine der mmu-miR-205-5p wurden aus der organischen Phase der Phenol-Guanidin-basierten RNA-Isolation die Proteine aufgereinigt (s. 3.3.1). Hierfür wurden Tumorproben von vier zufällig ausgewählten Curcumin-behandelten sowie vier Kontrolltieren genutzt. Die organische Phase der Proben wurde mit 300 µl 100 % Ethanol versetzt und mehrmals invertiert. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min mit 2.000 x g zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Der Überstand wurde sorgfältig in neue 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, 1,5 ml Isopropanol (gekühlt auf 4°C) hinzupipettiert und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min mit 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert, um die Proteine zu fällen. Der Überstand wurde verworfen und als Phenol-haltiger Abfall gesondert entsorgt (organische Lösemittel). Die Protein-Pellets wurden nun dreimal mit je 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol (gekühlt auf 4°C) gewaschen. Dafür wurden die Proben für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 5 min mit 7.500 x g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Pellets in 2 ml 100 % Ethanol aufgenommen, stark geschüttelt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min mit 7.500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Über-

stand wurde nun sorgfältig entfernt und das Pellet 5-10 min unter einem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 1 % SDS komplett gelöst. Falls notwendig, wurden die Proben für 30 min bei 50°C inkubiert, um alle Partikel in Lösung zu bringen. Alle unlöslichen Zellbestandteile wurden nun für 10 min bei 10.000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt.

Guanidin-Hydrochlorid:

0,3 M (2,86 g) Guanidin-Hydrochlorid
in 100 ml 95 % Ethanol lösen

1 % SDS:

1 g SDS
in 100 ml DEPC-Wasser lösen

DEPC-Wasser:

0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in Aqua
bidest. lösen, für 1 h bei RT rühren,
autoklavieren und über Nacht abkühlen lassen

3.4.2.3. Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ermöglicht eine elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine. Das im Überschuss vorhandene, negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an und kompensiert so deren Eigenladung. Auf diese Weise entsteht ein gleichartiges Masse-Ladungs-Verhältnis, so dass die Wanderung der denaturierten Proteine im Gel entsprechend ihrer Größe in Richtung der positiven Elektrode erfolgt. Im Vorfeld der PAGE werden die Proben in Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen. Dies soll die in den Proteinen enthaltenen Bisulfidbrücken durch Reduktion aufspalten. Zusammen mit dem Aufkochen führt dies zu einem Aufbrechen der quartären und tertiären Proteinstrukturen (Denaturierung) und Streckung des Proteins (Linearisierung). Bei der Methode nach Laemmli (1970) werden die Proben in einem Sammelgel mit niedrigem Acrylamid-Gehalt aufkonzentriert und wandern dann in das Trenngel ein.

Die SDS-PAGE wurde in einer Elektrophoresekkammer (*Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System*, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) durchgeführt, in der die auspolymerisierten Gele nach Herstellerangaben eingespannt wurden. Um die elektrophoretische Auftrennung der Proteine zu ermöglichen, wurden 500 ml SDS-Laufpuffer in die Elektrophoresekkammer gegeben, wobei die Gele komplett überdeckt waren. Die Pro-

teinkonzentration wurde im Vorfeld photometrisch bestimmt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt in den SDS-Ladepuffer (5-fach) aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Dann wurden pro Spur jeweils 7,5 µg einer Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Als Größenmarker wurden in einer weiteren Spur 5 µl (= 1 µg) gefärbter Proteinmarker aufgetragen (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific). Die Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei konstant 80 V für 15 min, die Auftrennung im Trenngel bei konstant 140 V für 40 bis 60 min. Unmittelbar im Anschluss an die PAGE wurden die Proteine im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Bio-Rad Laboratories, Inc.) übertragen, um eine spezifische Analyse zu ermöglichen.

SDS-Laufpuffer:

30 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

Die Chemikalien in 500 ml Aqua bidest. lösen,
dann auf 1000 ml auffüllen

SDS-Ladepuffer (5-fach):

225 mM Tris-HCL pH 6,8

50 % Glycerol

5 % SDS

0,05 % Bromphenolblau

250 mM DTT

Die Chemikalien in Aqua bidest. lösen, den
Puffer aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

10%-SDS-Trenngel (2 Gele):

2,50 ml Acrylamid (30 %)

1,90 ml 1,5 M Tris-HCl/SDS (pH 8,8)

3,00 ml H₂O

50 µl APS (10 %)

10 µl TEMED

Die Lösungen gut mischen, zwischen abgedichtete Glasplatten (~ 8 x 10 cm, Abstand: 0,75 mm) gießen und mit Wasser überschichten. Für circa 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen, das Wasser entfernen und mit Sammelgel überschichten.

SDS-Sammelgel (2 Gele):

0,4 ml Acrylamid (30 %)

0,6 ml 0,5 M Tris-HCl/SDS (pH 6,8)

1,5 ml H₂O

25 µl APS (10 %)

5 µl TEMED

Die Lösungen gut mischen, auf das Sammelgel gießen und Kamm (10-15 Taschen) zur Ausbildung von Probestaschen reinstecken. Für circa 5 min bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen.

3.4.2.4. Western Blot-Transfer

Die Übertragung der linearisierten Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Bio-Rad Laboratories, Inc.) erfolgte ebenfalls elektrophoretisch. Hierfür wurde die Membran auf dem Gel platziert und zwischen zwei Lagen Whatman-Filterpapier der gleichen Größe gelegt. Dabei wurde das Einschließen von Luftblasen zwischen Gel und Membran sorgfältig vermieden, da es den Transfer der Proteine gestört hätte. Alle Lagen wurden zuvor für 5 min in 1-fachen Transferpuffer auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Transfer erfolgte für 1 h in einer gekühlten *wet-blotting-chamber* (Mini Trans-Blot System, Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei einer konstanten Stromstärke von 0,23 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und dann für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Ponceaurot bindet unspezifisch und reversibel an die transferierten Proteine. Auf diese Weise kann die Qualität des Transfers beurteilt werden. Der in der Lösung enthaltene Eisessig fixiert zusätzlich die Proteine an die Membran. Von jeder gefärbten Membran wurde mit einem handelsüblichen Scanner ein digitales Bild zur Archivierung erstellt. Danach wurden die Membranen mit Aqua bidest. entfärbt.

Der gezielte Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran erfolgte durch Markierung mit spezifischen Antikörpern, welche die enzymatische Umsetzung von Chromogenen erlaubten. Hierfür wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit 3 % magerem Milchpulver in TBS-T (w / v) auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper auf der Membran zu blockieren. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C unter konstantem Schütteln (Tab. 5). Freie und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Wa-

schen mit TBS-T für 10 min bei Raumtemperatur entfernt. Nun erfolgte die Inkubation der Membran mit Enzym (*horse-radish-peroxidase*, *hrp*)-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:5.000 in 3 %-Milch TBS-T), die gegen den Fc-Teil der primären spezifischen Antikörper gerichtet waren für 1 h bei Raumtemperatur (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen. Aufgelistet sind Antigene, Antikörper (Typ, Spezies, Firma) und Verdünnungen.

Antigen	Erster Antikörper	Verdünnung	Zweiter Antikörper
NF- κ B, p65 (C-20) ¹	Polyklonal, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)	1:250	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Kaninchen IgG, Dianova (Hamburg, Deutschland)
PCAF ¹	Polyklonal, Kaninchen, Abcam, Cambridge (Vereinigtes Königreich)	1:100	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Kaninchen IgG, Dianova
Bcl-2	Monoklonal, Maus, Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Maus IgG, Dianova
PCNA	Monoklonal, Maus, DAKO (Glostrup, Dänemark)	1:1000	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Maus IgG, Dianova
E2F1	Polyklonal, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology	1:200	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Kaninchen IgG, Dianova
α -Tubulin (T9026)	Monoklonal, Maus, Sigma-Aldrich	1:5000	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Maus IgG, Dianova
ErbB3	Polyklonal, Schaf, R&D Systems (Minneapolis, USA)	1:2000	Peroxidase-konjugiert, Kaninchen-gegen-Schaf IgG, Dianova

¹Diese Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Römer, Carreras Institut für Immun- und Gentherapie, Universität des Saarlands, zur Verfügung gestellt.

Das Enzym *hrp* erlaubte die Oxidation eines zyklischen Luminophors. Hierbei fallen angeregte Elektronen in ihren Grundzustand zurück und die freiwerdende Energie wird als Lichtquant (Chemilumineszenz) abgegeben. Die Chemilumineszenz kann über die Schwärzung autoradiographischer Filme detektiert werden. Hierfür wurde die Membran für 1 min bei Raumtemperatur mit dem Gemisch aus ECL-Lösung-I und -II nach Angaben des Herstellers (ECLPlus, Amersham, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich) inkubiert. In diesem Fall diente PS-3-Acridan als Luminophor, dessen Resonanzstruktur mit drei aromatischen Ringen bei der Oxidation zum Acridiniumester eine intensive Chemilumineszenz im blauen Bereich (450 nm) emittierte. Je nach verwendetem Antikörper wurden die aufgelegten Filme (Hyperfilm; GE Healthcare) 1-15 min belichtet. Die durch die Chemilumineszenzsignale entstandenen Schwärzungen des Films wurden densitometrisch mit dem *gel analysis tool* der Software *ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, USA) ausgewertet.

10-fach Transfer-Puffer:

30 g Tris

144,13 g Glycin

Die Chemikalien in 1000 ml Aqua bidest. lösen.

Für den Transfer 100 ml 10-fach Puffer mit
200 ml EtOH mischen und mit 700 ml Aqua
bidest. auffüllen

10-fach Ponceau S Lösung:

0,1 % Ponceau S

5 % Essigsäure

Die Chemikalien in Aqua bidest. lösen

TBS-T:

8,8 g NaCl

12,35 g Tris-HCl

Die Chemikalien in 700 ml Aqua bidest. lösen
und auf pH 7,4 einstellen

3.5. Versuchstiere und Haltung

Die Tierpflege und durchgeführten Experimente waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das lokale Tierschutzkomitee genehmigt (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung C1 Amtstierärztlicher Dienst, Lebensmittelüberwachung, Saarbrücken: Nr.: 07/2010) und wurden im Einklang mit den europäischen Tierschutzgesetzen (*European legislation on protection of animals*; Guide line 2010/63/EU) sowie den Leitlinien zur Pflege und Einsatz von Labortieren des *National Institute of Health* durchgeführt (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>; 8th Edition; 2011).

Alle Versuche wurden an männlichen C57BL/6 mit einem Gewicht von 20-22 g durchgeführt, um hormonelle Zyklus-bedingte Schwankungen in weiblichen Tieren zu umgehen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes mit einem 12 h Licht-/Dunkelzyklus sowie kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Tierfutter.

3.6. Diät

In den Tierversuchen wurde entweder eine 4%ige Curcumin-Diät oder Kontrollfutter verabreicht (Ratte/Maus Haltung, V153x, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Diese Curcumin-Konzentration entspricht etwa einer Tagesdosis von 160 mg bzw. 8 g/kg Körpergewicht. Für die Diät wurde Curcumin C3 Complex (Sabinsa Cooperation, East Windsor, USA) verwendet.

Limtrakul et. al (1997) fütterten 1 % Curcumin für 13 Wochen zur Chemoprävention von kutanen Tumoren. Da die Observationsperiode in der vorliegenden Arbeit nur 4 bzw. 6 Wochen betrug, wurde eine höher konzentrierte Curcumin-Diät als notwendig erachtet. Aufgrund der geringen Toxizität von Curcumin wurde die Curcumindosis von 4 % als sicher eingestuft (s. 2.2.5. *Toxizität*).

3.7. Tierexperimentelle Modelle

Um die Effekte einer Curcumin-haltigen Diät auf das Wachstum und die molekularen Eigenschaften von Melanomen zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle genutzt. Zum einen wurden B78H1-Zellsphäroide in der Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen untersucht, zum anderen wurde eine Zellsuspension aus B78H1 Zellen in die Flanken von C57BL/6 Mäusen injiziert. Das Modell der Rückenhautkammer ermöglichte eine kontinuierliche Analyse von Tumorwachstum und Neoangiogenese über 14 Tage mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (Menger et al., 2002; Laschke et al., 2011). Im Flankentumormodell erfolgte die Untersuchung des Tumorwachstums über 28 Tage mit kontinuierlicher Ultraschallüberwachung. Anschließend konnte ausreichend Probenmaterial für molekularbiologische und histochemische Untersuchungen gewonnen werden.

3.8. Tierexperimentelle Protokolle

Beide Tiermodelle werden nach Aspekten des Tierschutzes als geringe bis mäßige Belastung für die Tiere eingestuft. Täglich wurde kontrolliert, ob die Versuchstiere ein regelrechtes Freß-, Putz- und Schlafverhalten zeigten. Alle zwei Tage wurden Gewicht und Tumorgroße gemessen. Als Abbruchkriterien für die Versuche galten ein Gewichtsverlust von > 20%, ein Tumordurchmesser von > 15 mm sowie die Entstehung von Gewebenekrosen. Wenn nicht anders beschrieben, fanden die Eingriffe unter einer intraperitonealen Ketamin-Xylazin-Narkose (Ketamin: 75 mg/kg, Ketanest, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland; Xylazin: 15 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) statt. Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (200

mg/kg Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) getötet und Proben der Tumoren zur weiteren Analyse entnommen.

Für das Rückenhautkammermodell wurde den Mäusen 14 Tage vor Transplantation der Tumorsphäroide entweder die Curcumin-Diät (n=8) oder die Kontrolldiät (n=10) verabreicht. Elf Tage nach Beginn der Diät wurde jedem Tier eine Rückenhautkammer implantiert, in die drei Tage später jeweils ein Tumorsphäroid transplantiert wurde. Alle drei Tage wurden Tumorwachstum und Neoangiogenese fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet, die Tumoren inklusive eines umgebenden Hautareals von ca. 5 mm x 10 mm exzediert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jedem Tumor wurden mehrere histologische Schnitte angefertigt, um immunhistochemische Färbungen gegen Ki-67, cleaved-Caspase-3 und CD31 durchzuführen und damit die Auswirkung der Diät auf Zellproliferation, Apoptose und Neoangiogenese zu beurteilen (Abb. 14).

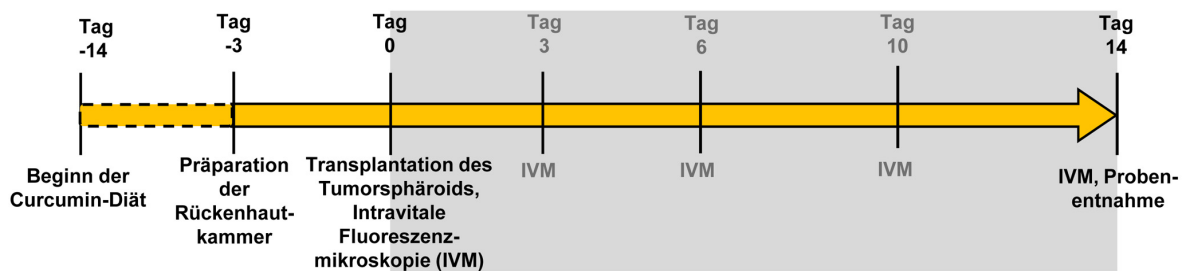


Abb. 14: Versuchsprotokoll zum Rückenhautkammermodell

Für eine Langzeitmessung des Tumorwachstums über 28 Tage wurden 14 Tage nach Beginn der Curcumin-Diät (n=8) bzw. der Kontrolldiät (n=8) B78H1 Melanomzellen in beide Flanken von C57BL/6 Mäusen injiziert (Flankentumormodell). An jedem zweiten Tag wurde die Tumorphäche mit einer Schieblehre kontrolliert (Abb. 15).

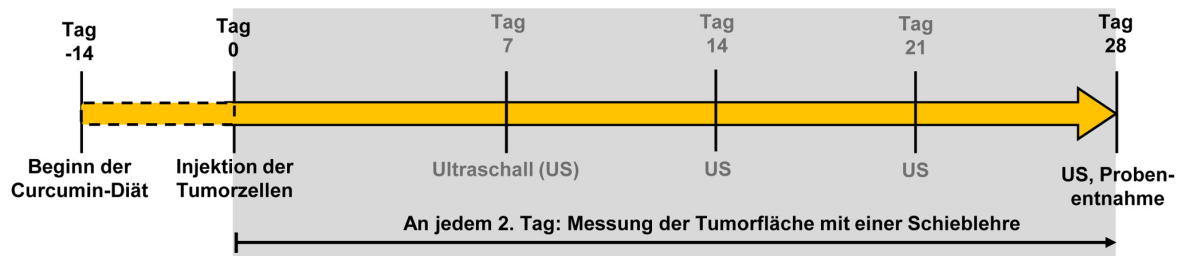


Abb. 15: Versuchsprotokoll zum Flankentumormodell

Alle sieben Tage wurde das Tumolvolumen mit dem hochauflösenden Ultraschall-System Vevo 770 (VisualSonics, Inc., Toronto, Kanada) gemessen. Nach 28 Tagen wurden die

Tiere getötet und Proben der Tumoren entweder zur Aufarbeitung von Ribonukleinsäuren oder Proteinen nativ in Flüssigstickstoff eingefroren oder mit Formalin fixiert, paraffiniert und immunhistochemisch gegen CD31 gefärbt.

3.9. Rückenhautkammermodell

3.9.1. Implantation der Rückenhautkammer

Für die Implantation der Rückenhautkammer wurden die Tiere wie bereits beschrieben narkotisiert und in Bauchlage positioniert. Auf dem Rücken wurde eine Fläche von etwa 4 cm x 5 cm mit einer Enthaarungscreme (asid®-med Enthaarungscreme, Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland) depiliert. Diese wurde nach etwa 5 min sorgfältig mit warmem Wasser abgewaschen, um Hautirritationen zu vermeiden. Anschließend wurde die Haut mit einem Desinfektionsspray (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

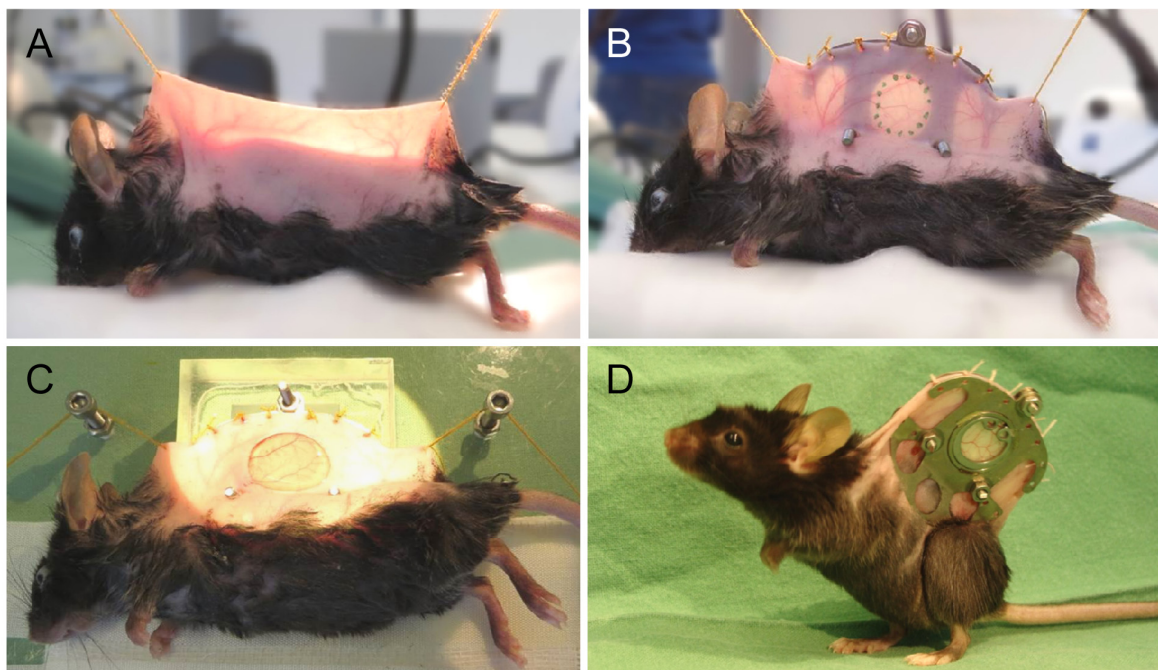


Abb. 16: Präparation der Rückenhautkammer. **A:** Fixierung einer dorsalen Hautfalte bei einer C57Bl/6 Maus mit Hilfe von Durchlicht. **B:** Fixierung des ersten Titanrahmens an der Rückhautfalte und Markierung des späteren Beobachtungsfensters. **C:** Observationsfenster nach mikrochirurgischer Entfernung der oberen Haut- und Muskelschichten. **D:** C57BL/6 Maus mit implantierter Rückenhautkammer nach 3 Tagen.

Eine Hautfalte wurde am Rücken angehoben und die Hauptäste der versorgenden Gefäße zur Deckung gebracht, um eine zentrale Lage der Rückenhautkammer zu gewährleisten. Dies wurde mittels Durchlicht kontrolliert. In dieser Position wurde die Rücken-

hautfalte cranial und caudal mit einem Faden fixiert (Abb. 16 A). Der erste Rahmen (Titan, 2 g, Sonderanfertigung) wurde nun an der Rückseite der Hautfalte mit sechs Einzelnähten am oberen Rand fixiert. Dann wurden an der Basis der Rückenhautfalte zwei Öffnungen für die Verbindungsschrauben der beiden Rahmen geschaffen. Diese wurden mit Schraubenmuttern am ersten Rahmen fixiert, die auch als Platzhalter zwischen beiden Kammer teilen dienten, um eine Kompression der Blutgefäße zu verhindern. Im Folgenden wurde mit Hilfe von Durchlicht eine runde Fläche eingezeichnet, die als Muster für das spätere Beobachtungsfenster diente (Abb. 16 B).

Die Maus wurde auf der Seite liegend unter einem Stereomikroskop (M651, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) platziert und die obere Hautschicht samt Subkutis, *Musculus panniculus carnosus* sowie beiden Retraktormuskeln im Bereich des Beobachtungsfensters komplett entfernt (Abb. 16 C, Abb. 17 A). Die Abnahme des unteren Retraktormuskels wurde sorgfältig durchgeführt, um Verletzungen des darunterliegenden Gewebes zu verhindern. Während der gesamten Prozedur wurde dieser Bereich mit angewärmtem 0,9 % NaCl (B. Braun Melsungen AG) feucht gehalten. Der zweite Rahmen wurde nun auf der Seite des Observationsfensters mit Schraubenmuttern an den Verbindungsschrauben fixiert, und die Kammer gründlich mit vorgewärmten 0,9 % NaCl gespült. Diese wurde dann luftdicht mit einem runden Deckglas verschlossen, das mit einem Sprengling am Rahmen der Rückenhautkammer befestigt wurde. Während der gesamten Implantation wurden die Tiere durch eine Infrarotlampe (Philips HP 3616, Philips, Hamburg, Deutschland) gewärmt. Schon nach wenigen Tagen hatten sich die Tiere vom Eingriff erholt und wiesen ein normales Verhalten auf (Abb. 16 D).

3.9.2. Generierung und Transplantation der Tumorsphäroide

Die Tumorsphäroide wurden nach Konur et al. (1998) in einer Suspensionskultur auf einer nicht-adhesiven Oberfläche generiert. Hierfür wurde 1 %ige Agarose geschmolzen, je 40 µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert, und dann bei Raumtemperatur auspolymerisieren gelassen. Nun wurden B78H1 Zellen geerntet, gewaschen und mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. In jedes Well wurden 5×10^4 Zellen in 100 µl Medium pipettiert. Nach 3 Tagen Kultivierung unter Standardbedingungen bildeten sich kugelförmige Zellhaufen (Sphäroide) aus. Diese wurden vor dem Einbringen in die Rückenhautkammer für 15 min im Dunkeln mit Bisbenzimid (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Bis zur Transplantation wurden die Sphäroide in einer Petrischale mit Medium auf einer 37°C-warmen Wärmeplatte aufbewahrt.

Die Transplantation der Tumorsphäroide erfolgte drei Tage nach der Implantation der Rückenhautkammer, damit sich die Tiere ausreichend von dem Eingriff erholen konnten. Für diesen Vorgang wurden die Mäuse narkotisiert, auf einer Plexiglasbühne

fixiert und auf der Seite liegend unter einem Stereomikroskop (Leica Microsystems GmbH) platziert. Das Deckglas über dem Beobachtungsfenster wurde entfernt und dieses gründlich mit 5 ml vorgewärmten 0,9 % NaCl (B. Braun) gespült. Die überschüssige Flüssigkeit wurde nun sorgfältig mit einem Tupfer abgesaugt und das Tumorsphäroid vorsichtig in der oberen Hälfte der Kammer auf den quergestreiften Muskel (*Musculus panniculus carnosus*) platziert (Abb. 17 A).

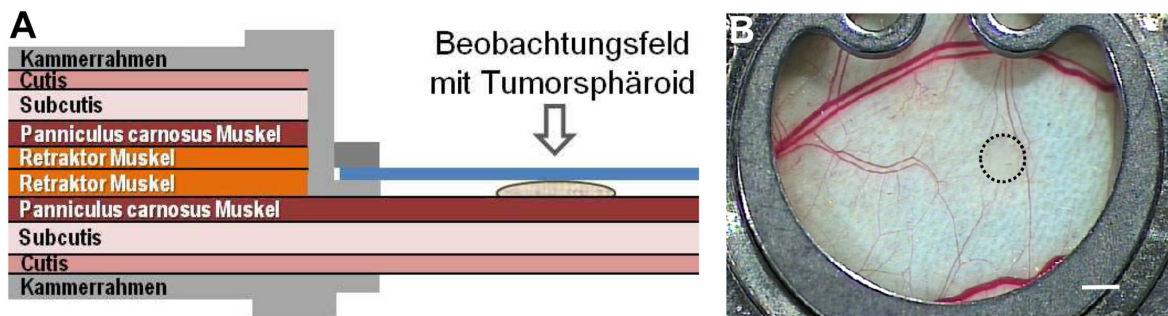


Abb. 17: Transplantiertes Tumorsphäroid. **A:** Schematische Darstellung eines Querschnitts der implantierten Rückenhautkammer mit Tumorsphäroid (Laschke et al., 2011). **B:** Makroskopische Aufnahme der Rückenhautkammer mit Tumorsphäroid an Tag 0 (schwarz umrandet). Maßstab: 1 mm.

Danach wurde das Observationssfeld mit einem neuen Deckglas und Sprengring wieder verschlossen. Hierbei wurde das Einschließen von Luftblasen sowie Reizungen des Gewebes vermieden, um Entzündungsreaktionen vorzubeugen. Die Lage des Tumors wurde unverzüglich mit dem Stereomikroskop kontrolliert und Video-dokumentiert (Abb. 17 B).

3.9.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) wurden die Tiere narkotisiert und auf einer Plexiglasbühne fixiert. Als Kontrastmittel wurden 100 µl 5 % Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran 150.000 (Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz) retrobulbär intravenös injiziert. Die Tumoren wurden mit einem Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W-Quecksilberdampfampe (HBO, Osram, München, Deutschland) und einem Filter für blaue Lichtemission (Anregungswellenlänge: 450 – 490 nm, Emissionswellenlänge: > 520 nm) mikroskopiert. Aufgrund des großen Arbeitsabstandes zum Präparat wurden „long-distance“ Objektive verwendet. Diese ermöglichten 4-, 5-, 10- und 20-fache optische Vergrößerungen. Die Aufnahmen wurden mit einer hochempfindlichen Videokamera (FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet und mit einem DVD-Rekorder (DVD HR 775, Samsung, Seoul, Südkorea) auf DVDs gebrannt (Abb. 18).

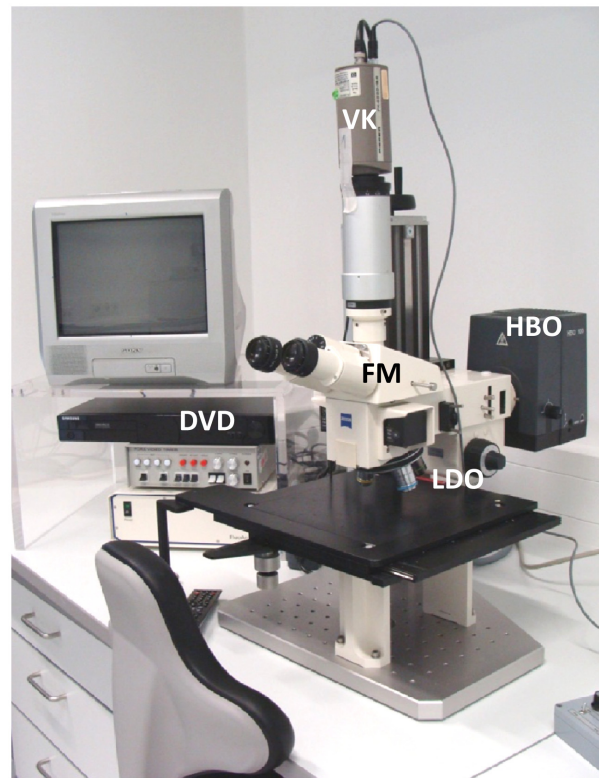


Abb. 18: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Aufbau des Fluoreszenzmikroskops (FM) mit Quecksilberdampflampe (HBO), long distance Objektiven (LDO) und Video-Dokumentationssystem mit Videokamera (VK) und DVD-Rekorder (DVD).

Die Auswertung der Daten erfolgte *offline* mit Hilfe der Software CaplImage (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Die Analysen umfassten die Messung der Tumorgroße [mm^2] und der funktionellen Kapillardichte [cm/cm^2]. Diese ist definiert als die Gesamtlänge der perfundierten Gefäße pro Sichtfeld. In dieser Arbeit wurde die funktionelle Kapillardichte des kompletten Tumorsphäroids analysiert.

3.10. Flankentumormodell

Die Generierung der Flankentumoren sowie die Ultraschallmessungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung durch Jeannette Rudzitis-Auth, Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes.

3.10.1. Generierung der Flankentumoren

Um die Flankentumoren zu generieren wurden männliche C57BL/6 Mäuse kurzzeitig mit einem Gemisch aus 4 % Isofluran und Sauerstoff anästhesiert. Jeder Maus wurden pro Flanke 1×10^5 B78H1 Melanomzellen in einem Volumen von 50 μl PBS subkutan injiziert.

Die sich entwickelnden Tumoren wurden alle zwei Tage mit einer Schieblehre und alle sieben Tage mittels hochauflösenden Ultraschalls vermessen.

3.10.2. Ultraschallmessung

Für die Ultraschallmessung wurden die Tiere mit einem Gemisch aus 4 % Isofluran und Sauerstoff anästhesiert und in Rückenlage auf einer beheizten Messbühne fixiert (Abb. 19).

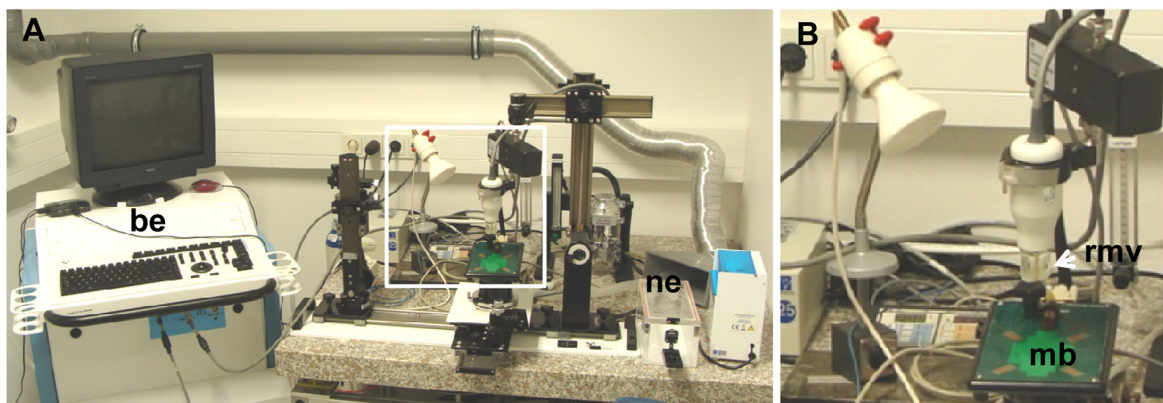


Abb. 19: Ultraschalleinheit. **A:** Übersichtsaufnahme des Ultraschallsystems mit Bedienungseinheit (be), Messbühne (mb) und Narkoseeinheit (ne). **B:** Der Bildausschnitt aus A zeigt die beheizbare Messbühne (mb) und den RMV-707B-Schallkopf (rmv) im Detail.

Die Narkose wurde während der Untersuchung über eine Atemmaske bei einer Konzentration von 2 % Isofluran (Baxter) aufrechterhalten. Vor der Ultraschallmessung wurden die Flanken der Tiere großzügig mit Ultraschallgel (Aquasonic 100, Parker Laboratories Inc, Fairfield, USA) bedeckt, um einen Verlust der Bildqualität durch Interferenzen an Luftblasen zu vermeiden. Die Messbühne ermöglichte aufgrund einer Motorunterstützung eine definierte, lineare Führung des *realtime microvisualization* (RMV)-707B-Schallkopfes (30 MHz, Visual Sonics) über die Flanke der Maus.

Um zwei-dimensionale Bilder zu erhalten, wurden der Tumor und angrenzende Gebiete mit einem Sichtfeld von 17 mm x 17 mm in 100 µm-Intervallen aufgenommen. Aus diesen Bildern wurden die Tumoren mittels der Vevo770 V2.3.0 Software (Visual Sonics) dreidimensional rekonstruiert und das Volumen berechnet. Hierfür wurden zuerst alle 200 µm manuell die Umrisse der Tumoren in den zwei-dimensionalen Bildern eingezeichnet. Basierend auf diesen Markierungen berechnete die Software das Tumolvolumen.

3.11. Histologie und Immunhistochemie

Die Anfertigung der histologischen Schnitte und immunhistochemischen Färbungen wurde freundlicherweise von Frau Janine Becker, Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, durchgeführt. Nach Beendigung der Tierversuche wurden die Tumoren aus den Rückenhautkammern bzw. Flanken exzidiert und für mindestens 24 h in 4 % Formaldehyd fixiert. Für die weiteren Analysen wurden die Proben in Paraffin eingebettet und in 2 µm-dicke Schnitte geschnitten. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte dreimal für je 3 min in Xylol inkubiert und danach für jeweils 3 min in einer absteigenden Alkoholreihe (von 100 % bis 70 % EtOH) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte großzügig in H₂O bidest. gespült und für 10 min in 3 % H₂O₂ bei Raumtemperatur inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blocken. Im Folgenden wurden die Schnitte wieder mit H₂O bidest. gewaschen und für 10 min in Citratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle gekocht. Dies diente zur Demaskierung von Antigenen, die durch die fixationsbedingte Vernetzung von Proteinen durch Methylenbrücken verhüllt wurden. Die Schnitte wurden mit PBS gespült und anschließend mit 3 % Serum-PBS in einer feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Präparate wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper benetzt, provisorisch eingedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert (Tab. 6). Am nächsten Tag wurde das Deckglas wieder entfernt, die Proben zweimal für 3-5 min mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 3-5 min mit PBS gewaschen und für 5 min mit 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen gefärbt (Tab. 6). Nun wurden die Schnitte erneut für 5 min mit H₂O bidest. gespült und mit Hämatoxilin nach Meyer gegengefärbt. Hierfür wurden die Schnitte drei-bis fünfmal in die Färbelösung eingetaucht, mit H₂O bidest. gewaschen, für 8 min mit Leitungswasser gewässert und wiederum mit H₂O bidest. gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (von 70 % bis 100 % EtOH) und in Xylol (dreimal für je 3 min) zur Entwässerung inkubiert. Während der Färbung wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Schnitte nicht beschädigt wurden und nicht austrockneten.

Bei einer Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern entfiel im Vorfeld die Inaktivierung der endogenen Peroxidasen, die Inkubation mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin, sowie die Entwässerung der Schnitte. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde in diesem Fall mit Bisbenzimid (1:500, Sigma-Aldrich) anstelle von Hämatoxilin vorgenommen.

Die Analysen der immunhistochemischen Färbungen wurden entweder lichtmikroskopisch an einem BX60 (Olympus, Tokio, Japan) bzw. einem Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence, Osaka, Japan) durchgeführt. Für die Auswertung der cleaved-Caspase-3-

und Ki-67-gefärbten Schnitte wurden die positiven Zellen pro Schnitt in fünf Sichtfeldern (*high power fields*; 40-fache Vergrößerung) ausgezählt und als prozentualer Anteil aller Zellen pro Sichtfeld dargestellt. Für die Auswertung der Gefäßdichte wurden die CD31-positiven Signale entweder im gesamten Tumor (Rückenhautkammermodell) oder in je vier Sichtfeldern (Flankenmodell) gezählt (10-fache Vergrößerung) und pro Flächeneinheit (mm²) angegeben.

Citratpuffer:

8,77 g NaCl

2,88 g Citronensäure

Die Chemikalien in 800 ml Aqua bidest. lösen,
pH 6 mit 0,5 M NaOH einstellen und auf 1000
ml auffüllen.

Tab. 6: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie. Aufgelistet sind Antigene, Spezifizierung der Antikörper und Verdünnungen.

Antigen	Erster Antikörper	Verdün- nung	Zweiter Antikörper	Verdün- nung	Chromogen
cleaved Caspase-3	Polyklonal, Kaninchen (Cell Signaling Technology)	1:100	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Kaninchen (Dianova)	1:200	3,3'Diamino-benzidin
Ki-67	Polyklonal, Kaninchen (Abcam)	1:2000	Peroxidase-konjugiert, Ziege-gegen-Kaninchen (Dianova)	1:200	3,3'Diamino-benzidin
CD31	Monoklonal, Ratte (Dianova)	1:30	Cyanine-3 gekoppelt, Ziege-gegen- Ratte (Dianova)	1:50	-

3.12. Statistische Analysen

Die elektronische Verarbeitung der Datensätze erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Daten wurden graphisch als Mittelwerte (*mean*) und dem Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) dargestellt. Für die Western Blot-Analysen wurde die relative Expression und für qRT-PCR-Daten die vielfache Expression verglichen zur Kontrolle abgebildet. Die Daten wurden zuerst auf eine Normalverteilung hin überprüft. Unterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen wurden mit dem zweiseitigen Student's *t*-Test berechnet. Um Verlaufseffekte innerhalb einer experimentellen Gruppe über die Dauer des Experimentes hinweg zu testen, wurde die Abweichungsanalyse für wiederholte Messungen (*one-way analysis of variance for repeated measures*, ANOVA) ange-

wendet. In den *post hoc*-Analysen erfolgte eine Anpassung des alpha-Fehlers nach Bonferroni, um für wiederholte Messungen zu korrigieren. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Verwendung der *SigmaStat Statistical Software* (Version 2.03; Systat Software Inc., San Jose, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Auswirkungen pyrolytischer Prozesse auf Curcumin

4.1.1. Pyrolyse von Curcumin

Das Mischen von Curcumin mit Fetten verminderte die im geringen Maße vorhandene, spontane Bildung von hydrophilen Isoformen (Abb. 20). Nach der Pyrolyse von Curcumin, sowohl mit als auch ohne Fettmatrix, konnten verstärkt hydrophilere Curcumin-, BMC- und BDMC-Isoformen, mit verringerten Retentionszeiten, detektiert werden.

Bei der Durchführung der Curcuminpyrolyse ohne Kokosfett bzw. Olivenöl wurden vermehrt Curcumin- und Dehydrocurcumin-Dimere mit einer höheren Retentionszeit (11,9 bzw. 12,4 min) als Curcumin (11,7 min) nachgewiesen. Außerdem wurde ein Hauptprodukt mit einer Retentionszeit von 9,6 min und einem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) von 327 entsprechend einem Molekulargewicht von 326 g/mol in allen pyrolysierten Proben detektiert.

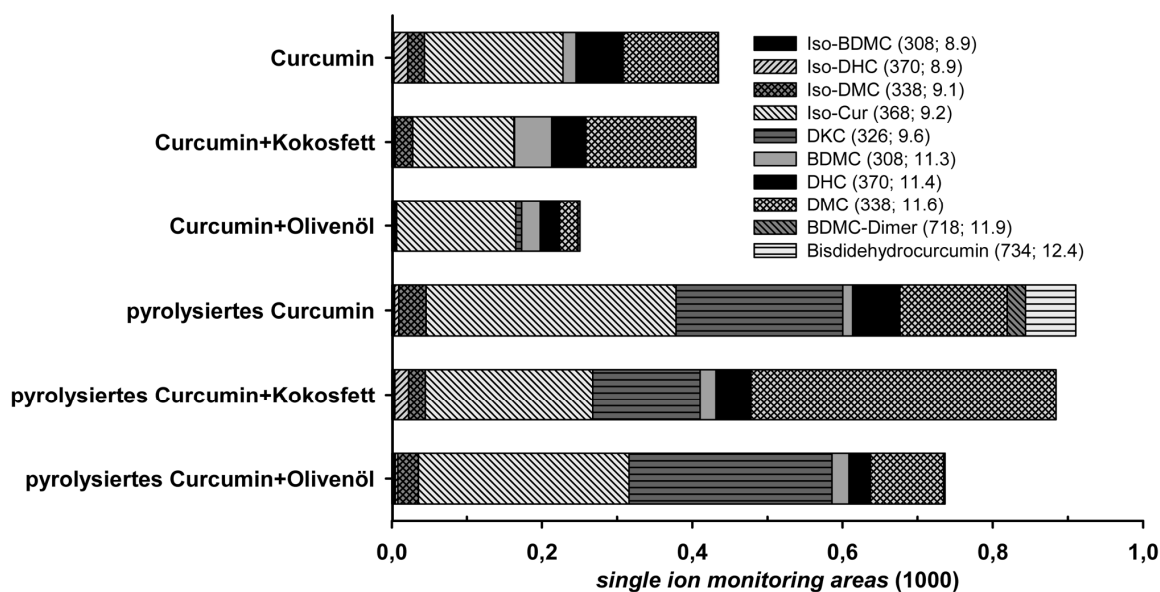


Abb. 20: Pyrolyseprodukte von Curcumin. Die Produkte der pyrolysierten und unpyrolysierten Proben mit und ohne Fettmatrizen wurden mittels Umkehrphasen-HPLC untersucht. Der Produktgehalt ist in single ion monitoring areas (1000) als Mittelwert der Versuche wiedergegeben. Zu jedem Produkt sind das molekulare Gewicht (g/mol) und die Retentionszeit (min) angegeben. Bisdemethoxycurcumin (BDMC), Curcumin (Cur), Dihydrocurcumin (DHC), Deketencurcumin (DKC), Demethoxycurcumin (DMC). $n=3$.

In Folgeversuchen wurde dieses Hauptprodukt durch Dr. Stefan Böttcher (Pharmazeutische und Medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes) mit Hilfe einer präpa-

rativen HPLC isoliert und kernspinmagnetresonanzspektroskopisch als 1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one (Deketencurcumin) identifiziert (Abb. 21).

Zwischen den einzelnen Messreihen der Pyrolyseprodukte waren große Schwankungen festzustellen. Dies wurde möglicherweise durch ungleichmäßige Aufheizungsprozesse verursacht. Die vorliegende Analyse ist daher qualitativer Natur.

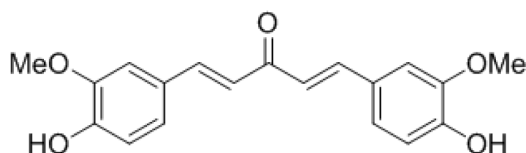


Abb. 21: Strukturformel des als Deketencurcumin identifizierten Pyrolyseproduktes mit dem Molekulargewicht von 326 g/mol.

4.1.2. Zelluläre Absorption von Curcuminderivaten

In einer qualitativen Analyse fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zeigten B78H1 Melanomzellen, die mit Deketencurcumin und pyrolysiertem Curcumin inkubiert wurden, eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Diese diente als Anhaltspunkt für eine verbesserte Aufnahme der Pyrolyseprodukte im Vergleich zu unbehandeltem Curcumin (Abb. 22).

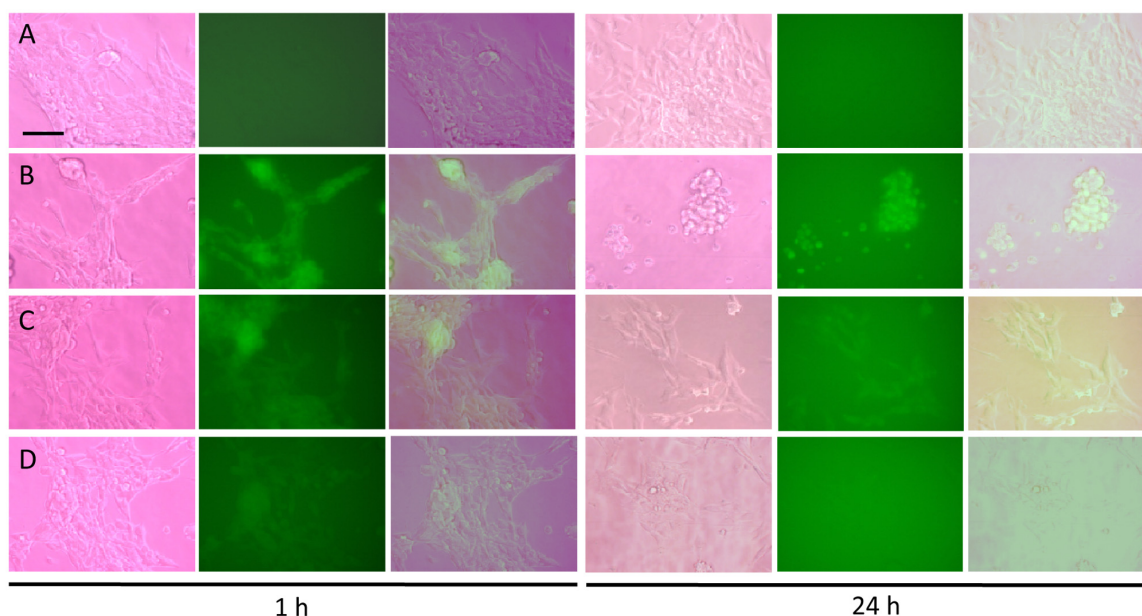


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 1 h und 24 h von B78H1 Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 μ M Deketencurcumin (B), pyrolysiertem Curcumin (C), Curcumin (D) oder DMSO als Vehikel (A) inkubiert. Die erste Spalte zeigt Hellfeldaufnahmen, die zweite Spalte Aufnahmen im GFP-Kanal und die dritte Spalte die Überlagerungen. Maßstab: 100 μ m, n=3.

Nach 24 h sahen die Zellen, die mit Curcumin bzw. pyrolysiertem Curcumin inkubiert wurden, wie auch die Zellen der Vehikelkontrolle, spindelförmig aus. Im Gegensatz dazu waren die Zellen, die mit Deketencurcumin behandelt wurden, abgerundet, was auf eine reduzierte Zellviabilität hindeutet. Überdies war nach 24 h in den Curcumin-behandelten Zellen kein Fluoreszenzsignal mehr zu detektieren. Von den mit pyrolysiertem Curcumin inkubierten Zellen ging eine schwache Fluoreszenz aus. Die Deketencurcumin-behandelten Zellen hingegen emittierten auch nach 24 h noch deutliche Fluoreszenzsignale.

4.1.3. Zytotoxizität von Curcuminderivaten

Die Auswertung des WST-1-Assays zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität nach einer Inkubation Curcuminderivaten. Deketencurcumin reduzierte die Zellviabilität von B78H1 Melanomzellen von allen Derivaten am stärksten (Abb. 23 A).

Durchflußzytometrischen Analysen apoptotischer Zellen bestätigten diese Ergebnisse. Alle Curcuminderivate induzierten konzentrationsabhängig Apoptose in murinen B78H1 Melanomzellen (Abb. 23 B). Deketencurcumin (EC_{50} : 38,28 μ M) wies eine stärkere Apoptose-induzierende Aktivität auf als Curcumin (EC_{50} : 95,97 μ M) oder pyrolysiertes Curcumin (EC_{50} : 93,28 μ M) (Abb. 23B).

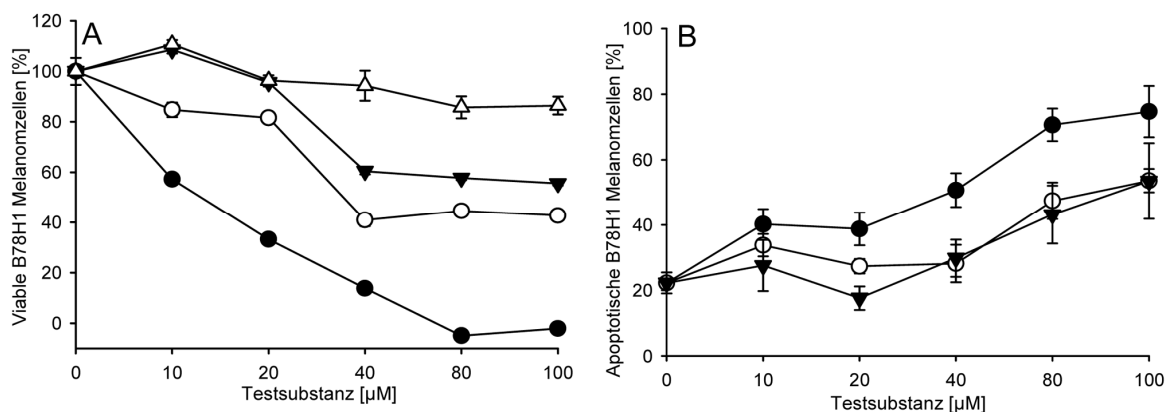


Abb. 23: Zytotoxizität von Curcuminderivaten. **A:** Viable B78H1 Melanomzellen (%) nach Inkubation mit Serienverdünnungen von Deketencurcumin (schwarze Punkte), pyrolysiertem Curcumin (weiße Punkte), Curcumin (schwarze Dreiecke) und DMSO-Vehikel (weiße Dreiecke) für 24 h. Mittelwert \pm SEM, $n=4$. **B:** Apoptotische B78H1 Melanomzellen (%) nach Inkubation mit Serienverdünnungen von Deketencurcumin (schwarze Punkte), pyrolysiertem Curcumin (weiße Punkte) und Curcumin (schwarze Dreiecke) nach 24 h. Die Prozentzahl der apoptotischen Zellen in der DMSO-Kontrolle wurde als Nullpunkt definiert. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

4.1.4. Effekte von Curcuminderivaten auf den Zellzyklus

Mit Hilfe durchflußzytometrischer Messungen wurde der Einfluss der Curcuminderivate auf den Zellzyklus unsynchronisierter B78H1 Melanomzellen bestimmt. Nach einer Be-

handlung mit 20 μ M Deketencurcumin für 24 h stieg der prozentuale Anteil an Zellen in der G2-Phase verglichen mit den anderen Derivaten und der Vehikelkontrolle signifikant an $P < 0,05$ (Abb. 24). Neben dem G2-Arrest induzierte Deketencurcumin außerdem einen Aufschub der Zellen in der S-Phase.

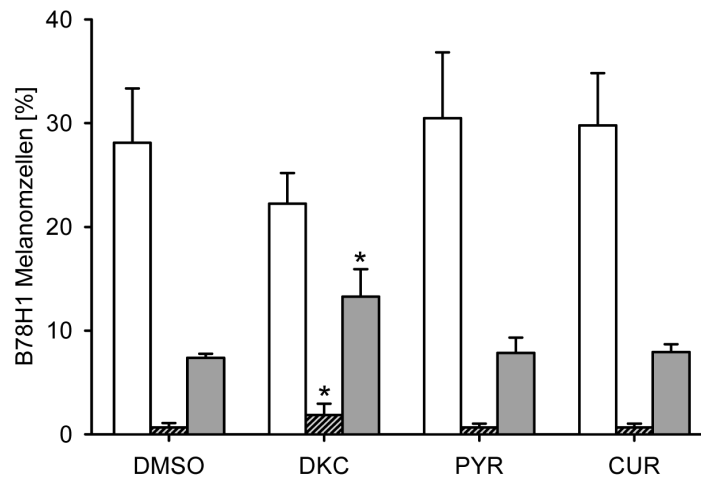


Abb. 24: Durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse. Der Anteil der B78H1 Melanomzellen (%) in den einzelnen Zellzyklusphasen, G1-Phase (weiße Balken), S-Phase (gestreifte Balken) und G2-Phase (dunkelgraue Balken) nach 24 h Inkubation mit 20 μ M Deketencurcumin (DKC), pyrolysiertem Curcumin (PYR), Curcumin (CUR) und DMSO-Vehikel. * $P < 0,05$ vs. DMSO, Mittelwert \pm SEM. $n=3$.

4.1.5. Effekte von Curcuminderivaten auf nukleäres NF- κ B

In Western Blot-Analysen ließ sich bezogen auf den nukleären Marker *histonacetyltransferase P300/CBP-associated factor* (PCAF) eine Abnahme an nukleärem NF- κ B in B78H1 Melanomzellen nach Inkubation mit den Curcuminderivaten feststellen (Abb. 25). Aufgrund der starken Schwankungen in der NF- κ B-Expression innerhalb der Versuche konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der verschiedenen Curcuminderivate detektiert werden. Die Versuche zeigten, dass die Curcuminderivate unabhängig von einer Entzündungsreaktion die Konzentration an konstitutiv expremiertem, nukleärem NF- κ B reduzierten.

Zwischen dem unstimulierten Basiswert und der mit TNF- α stimulierten DMSO-Kontrolle war kein Unterschied in der Expression von nukleärem NF- κ B nachzuweisen. Dies deutet auf einen Fehler im Versuchsaufbau hin. Entweder war das Zytokin inaktiv oder es lag bereits eine maximale Menge an nukleärem NF- κ B vor, so dass die Zellen sich gegenüber der Stimulation anerg verhielten.

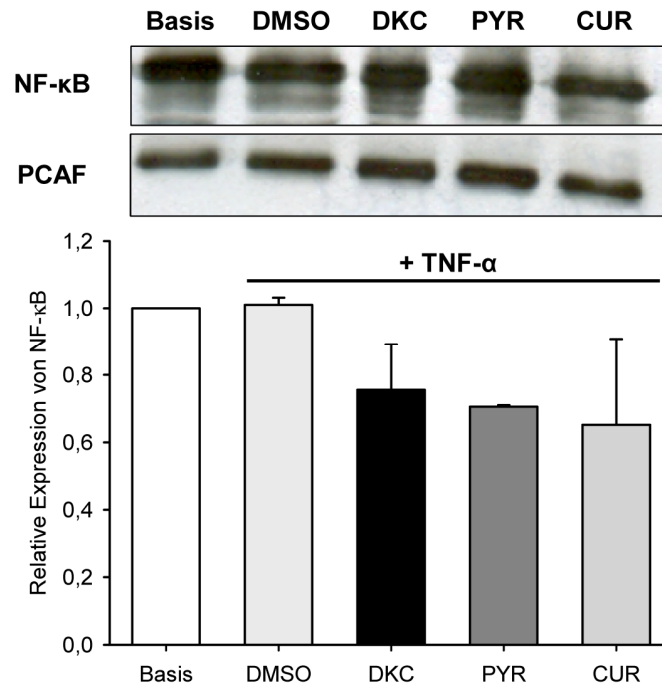


Abb. 25: Nukleäres NF- κ B in B78H1 Melanomzellen. Die durchschnittliche Menge an nukleärem NF- κ B nach 24 h Vorinkubation mit 20 μ M Deketencurcumin (DKC, schwarze Säule), pyrolysiertem Curcumin (PYR, dunkelgraue Säule), Curcumin (CUR, graue Säule) und DMSO-Vehikel (hellgraue Säule) und 6 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α verglichen zum Basiswert (weiße Säule) im Western Blot. Mittelwert \pm SE. $n=3$.

4.1.6. Zytotoxizität von Curcuminderivaten auf humane Monozyten

In weiteren Versuchen wurde die Zytotoxizität der Curcuminderivate auf humane PBMCs von drei gesunden Spendern durchflußzytometrisch untersucht. Aufgrund der hohen Standardabweichungen wurde diese Analyse nur zum qualitativen Vergleich mit der Messung der apoptotischen Tumorzellen nach Stimulation mit Curcuminderivaten herangezogen.

Deketencurcumin löste bei niedrigeren Konzentrationen Apoptose in Tumorzellen aus (EC_{50} : $\sim 38 \mu$ M) (Abb. 23) als in PBMCs (EC_{50} : $\sim 83 \mu$ M) (Abb. 26). Curcumin hingegen zeigte eine höhere Zytotoxizität gegen PBMCs (EC_{50} : $\sim 67 \mu$ M), als gegen Tumorzellen (EC_{50} : $\sim 96 \mu$ M) (Abb. 23). Pyrolysiertes Curcumin wirkte zwar nicht so potent auf Tumorzellen wie Deketencurcumin, zeigte allerdings von allen Derivaten die geringste Zytotoxizität gegen PBMCs (EC_{50} : $\sim 255 \mu$ M) (Abb. 26).

Die vorliegende Untersuchung zur Induktion der Apoptose durch Curcuminderivate in PBMCs wies starke Schwankungen innerhalb der Meßreihen auf. Dies lag an der großen biologischen Varianz und dem Immunstatus der drei Zellspender.

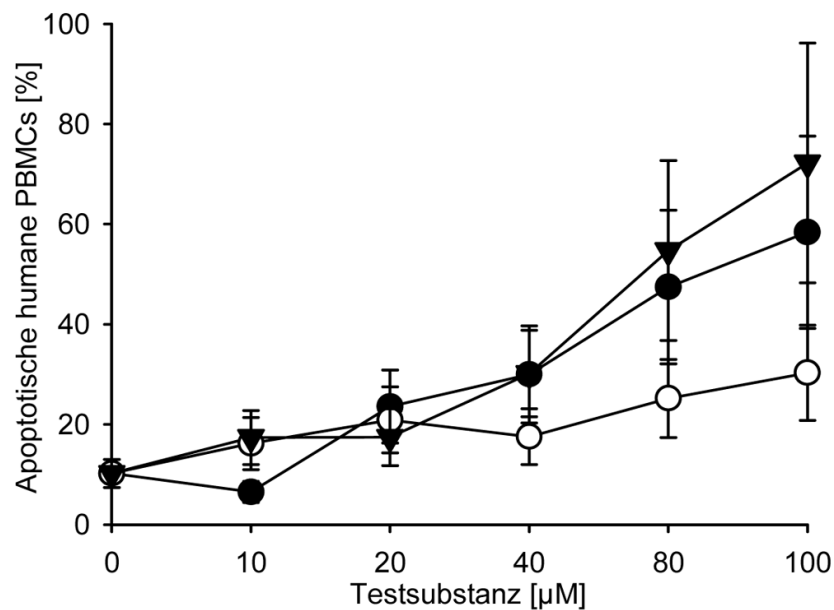


Abb. 26: Apoptotische PBMCs (%) nach Inkubation mit Serienverdünnungen von Deketencurcumin (schwarze Punkte), pyrolysiertem Curcumin (weiße Punkte) und Curcumin (schwarze Dreiecke) für 24 h. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

4.2. Effekte von diätischem Curcumin auf Melanome

4.2.1. Tumorwachstum und Neoangiogenese im Rückenhautkammermodell

Zwei Wochen nach der Transplantation der Tumorsphäroide (Tag 0, Abb. 27 A, B) in Rückenhautkammern von C57BL/6 Mäusen war die Größe der Tumoren bei den Curcumin-behandelten Tieren ($2,96 \pm 0,32 \text{ mm}^2$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($3,91 \pm 0,36 \text{ mm}^2$) signifikant reduziert ($P < 0,05$) (Abb. 27 C, D, G).

Weiterhin war die funktionelle Kapillardichte in den Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere ($140,7 \pm 5,9 \text{ cm/cm}^2$) verglichen mit den Tumoren der Kontrolltieren ($195,6 \pm 7,2 \text{ cm/cm}^2$) verringert ($P < 0,05$) (Abb. 27 E, F, H). Die Gefäßdichte wurde zudem in einer Endpunktanalyse immunhistochemisch mit einer Fluoreszenzfärbung gegen den endothelialen Zellmarker CD31 analysiert (Abb. 28 A, B). Auch die Zahl der CD31-positiven Zellen pro Fläche war bei den Curcumin-behandelten Tieren ($265,4 \pm 22,5 \text{ mm}^{-2}$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($344,1 \pm 28,8 \text{ mm}^{-2}$) signifikant reduziert ($P < 0,05$) (Abb. 28 C).

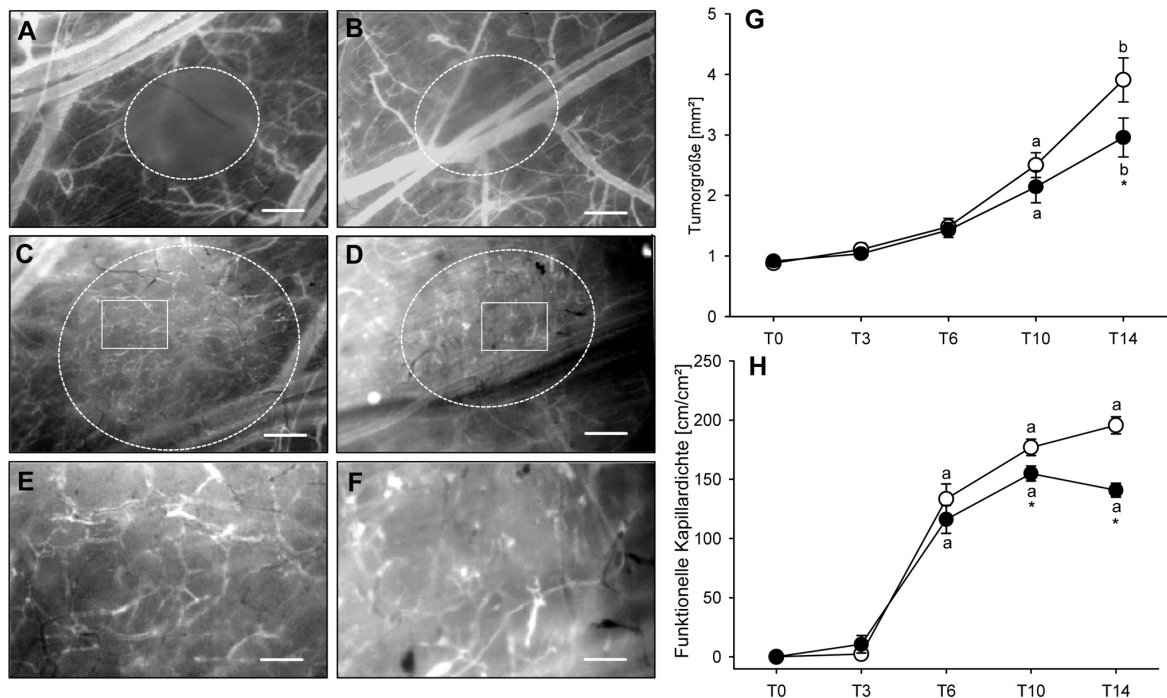


Abb. 27: Tumorwachstum und Neoangiogenese. **A-F:** IVM Aufnahmen der Rückenhautkammer zeigen Tumorsphäroide an Tag 0 (A, B) und Tag 14 (C, D) (umrandet mit weißer, gestrichelter Linie) und das Kapillarnetzwerk eines Kontroll- (A, C, E) und eines Curcumin-behandelten Tieres (B, D, F). Maßstab A-D: 380 μ m, E-F: 135 μ m. **G:** Tumorgröße (mm²) von Kontroll- (weiße Punkte, n=10) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Punkte, n=8). Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$ vs. Kontrolle, ^a $P < 0,05$ vs. T0-T6, ^b $P < 0,05$ vs. T0-T10. **H:** Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) in Tumoren von Kontroll- (weiße Punkte, n=10) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Punkte, n=8). Mittelwert \pm SEM * $P < 0,05$ vs. Kontrolle, ^a $P < 0,05$ vs. T0-T3.

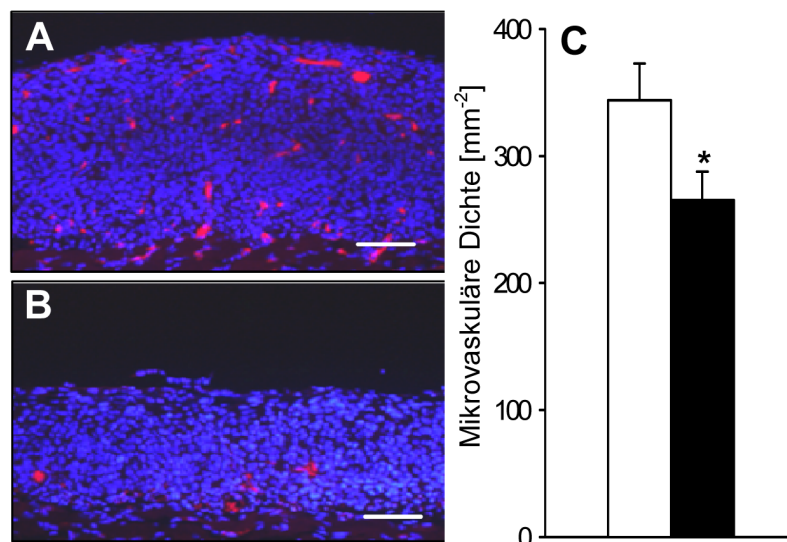


Abb. 28: Mikrovaskuläre Dichte. **A, B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Tumorsphäroiden mit CD31-positiven Blutgefäßen (rot) eines Kontroll- (A) und eines Curcumin-behandelten Tieres (B) an Tag 14. Zellkerne: blau. Maßstab: 90 μ m. **C:** Mikrovaskuläre Dichte (mm⁻²) in Tumorsphäroiden von Kontroll- (weißer Balken, n=10) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarzer Balken, n=8) nach 14 Tagen, pro Tier wurden 2 Schnitte ausgewertet. Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$.

4.2.2. Proliferation und Apoptose im Rückenhautkammermodell

Die Proliferation der Tumorzellen wurde anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen Ki-67 analysiert. Die Tumorsphäroide der Curcumin-behandelten Tiere zeigten signifikant weniger Ki-67-positive Zellen ($6,5 \pm 1,5 \%$) bezogen auf die Gesamtzahl an Zellen pro Sichtfeld, als die Tumorsphäroide der Kontrolltiere ($18,2 \pm 2,0 \%$) ($P < 0,05$) (Abb. 29).

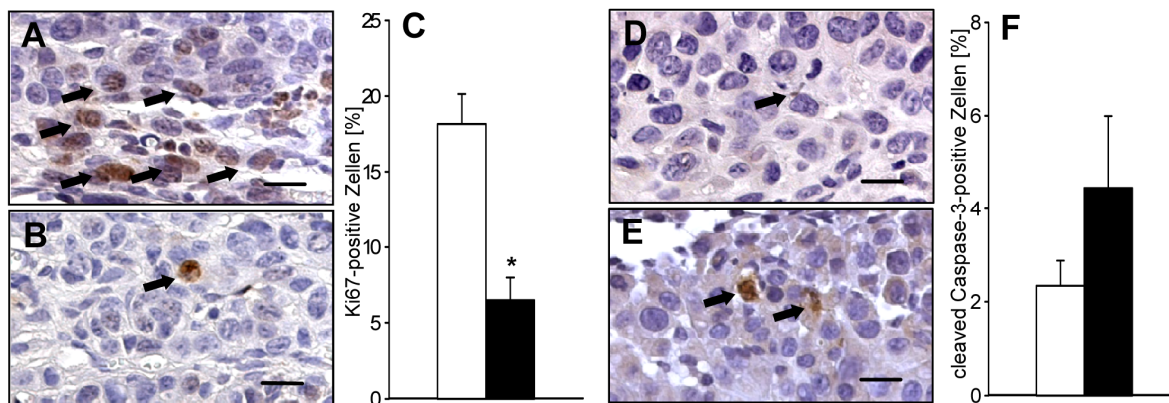


Abb. 29: Proliferation und Apoptose: **A, B:** Lichtmikroskopische Aufnahmen Ki-67-positiver Zellen (braun, exemplarisch mit Pfeilen markiert) in Tumorsphäroiden eines Kontroll- (A) und eines Curcumin-behandelten Tieres (B), Zellkerne: lila. Maßstab: 20 μ M. **C:** Anteil der Ki-67-positiven Zellen (%) in den Tumorsphäroiden von Kontroll- (weißer Balken, $n=10$) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarzer Balken, $n=8$). Mittelwert \pm SEM; $*P < 0,05$. **D, E:** Lichtmikroskopische Aufnahmen cleaved-Caspase-3-positiver Zellen (braun, exemplarisch mit Pfeilen markiert) in Tumorsphäroiden eines Kontroll- (D) und eines Curcumin-behandelten Tieres (E), Zellkerne: lila, Maßstab: 19 μ M. **F:** Anteil der cleaved-Caspase-3-positiven Zellen (%) in den Tumorsphäroiden von Kontroll- (weißer Balken, $n=10$) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarzer Balken, $n=8$). Mittelwert \pm SEM; P vs. Kontrolle: 0,24.

Die Zahl der apoptotischen Zellen in den Tumorsphäroiden wurde mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen cleaved-Caspase-3 untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen zwischen den Curcumin-behandelten ($4,4 \pm 1,6 \%$) und den Kontrolltieren ($2,3 \pm 0,5 \%$) festgestellt werden (P : 0,24) (Abb. 29).

4.2.3. Tumorwachstum und Neoangiogenese im Flankentumormodell

Im zweiten Teil der *in vivo* Analysen wurden B78H1 Melanomzellen in beide Flanken von männlichen C57BL/6 Mäusen injiziert und für 28 Tage mit Hilfe hochauflösender Ultraschallmessung untersucht. Makroskopisch zeigten die Curcumin-behandelten Tumoren, die an Tag 28 exzidiert wurden, oberflächlich weniger Blutgefäße (Abb. 30 A) sowie eine homogenere Oberflächenstruktur verglichen mit den Tumoren der Kontrollgruppe (Abb. 30 B). Ab dem 21. Tag konnte ein verzögertes Tumorwachstum bei den Curcumin-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 30 E). An

Tag 28 waren die Tumoren der Curcumin-behandelten Tumoren ($34,1 \pm 3,2 \text{ mm}^3$) signifikant kleiner als die der Kontrolltiere ($189,8 \pm 54,6 \text{ mm}^3$, $P < 0,05$) (Abb. 30 C, D, E).

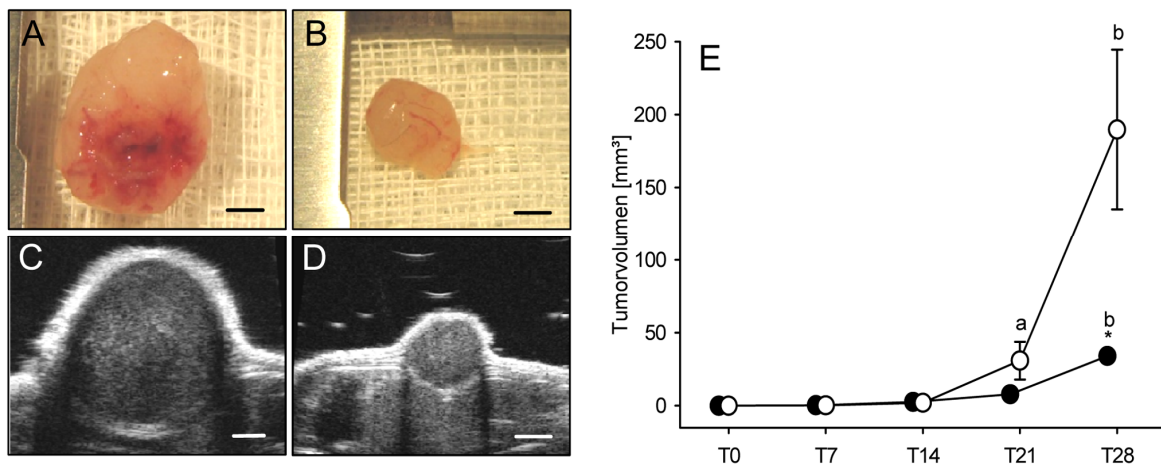


Abb. 30: Tumorwachstum im Flankenmodell. **A, B:** Makroskopische Aufnahmen von Flankentumoren eines Kontroll- (A) und eines Curcumin-behandelten Tieres (B) an Tag 28. Maßstab: 2,7 mm. **C, D:** Ultraschallaufnahmen von Flankentumoren eines Kontroll- (C) und eines Curcumin-behandelten Tieres (D) an Tag 28. Maßstab: 2,0 mm. **E:** Tumorvolumen (mm^3) von Kontroll- (weiße Punkte, $n=8$) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Punkte, $n=8$). Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$ vs. Kontrolle, ^a $P < 0,05$ vs. T0-T14, ^b $P < 0,05$ vs. T0-T21.

Die Auswertung der gegen CD31 gefärbten, histologischen Schnitte zeigte keine signifikante Unterschiede in der mikrovaskulären Dichte zwischen den Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere ($64 \pm 9 \text{ mm}^{-2}$) und der Kontrollgruppe ($82 \pm 8 \text{ mm}^{-2}$) ($P=0,142$) (Abb. 31).

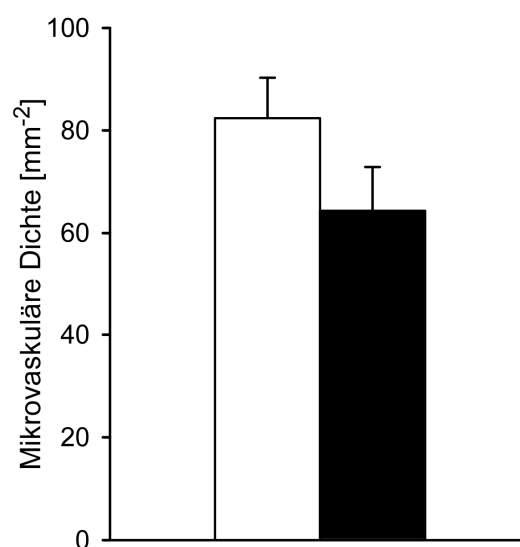


Abb. 31: Mikrovaskuläre Dichte (mm^{-2}) in Flankentumoren von Kontroll- (weißer Balken, $n=8$) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarzer Balken, $n=8$) nach 28 Tagen, Mittelwert \pm SEM.

4.2.4. Expression von NF- κ B in Flankentumoren

Die Expression von NF- κ B in den Flankentumoren wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. In den Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere war die Expression von NF- κ B verglichen zu den Kontrollen leicht reduziert (*Abb. 32*). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P=0,131$).

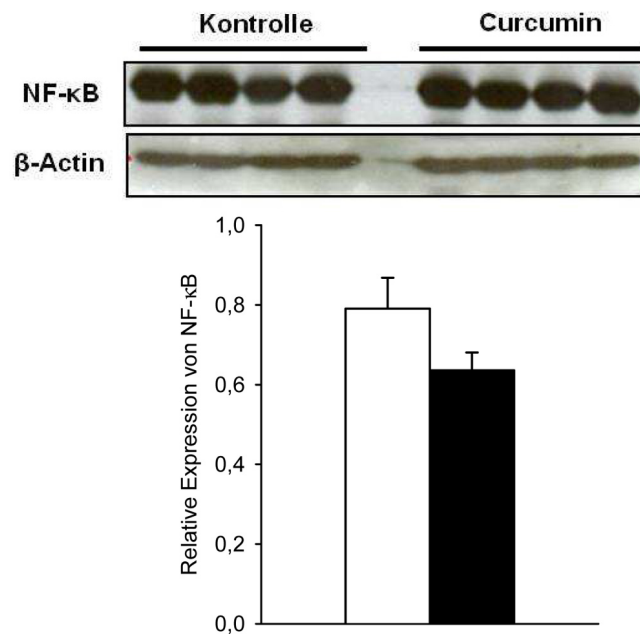


Abb. 32: Relative Expression von NF- κ B in Tumoren von Kontroll- (weiße Balken, $n=4$) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Balken, $n=4$). Mittelwert \pm SEM.

4.2.5. MiRNA-Profil der Flankentumoren

An Tag 28 wurden die Flankentumoren exzidiert, die gesamte RNA aus den Proben isoliert und anschließend auf *mouse Sure Print G3 miRAN V17.0 Micro-Array Chips* (Agilent Technologies) mit 1079 komplementären murinen miRNAs (annotiert nach Sanger miRBase 17) hybridisiert. Hierbei wurden durch einen unabhängigen, zweiseitigen Student's *t*-Test 147 miRNAs identifiziert, die signifikant durch die Curcumin-Diät modifiziert wurden (adjustierter *P*-Wert < 0,05). Von den 86 hochregulierten miRNAs wurden 49 mehr als zweifach hochreguliert. Weiterhin wurden 61 miRNAs in ihrer Expression herunterreguliert, hiervon waren 34 um mehr als die Hälfte reduziert (*Anhang, Tab. 9*).

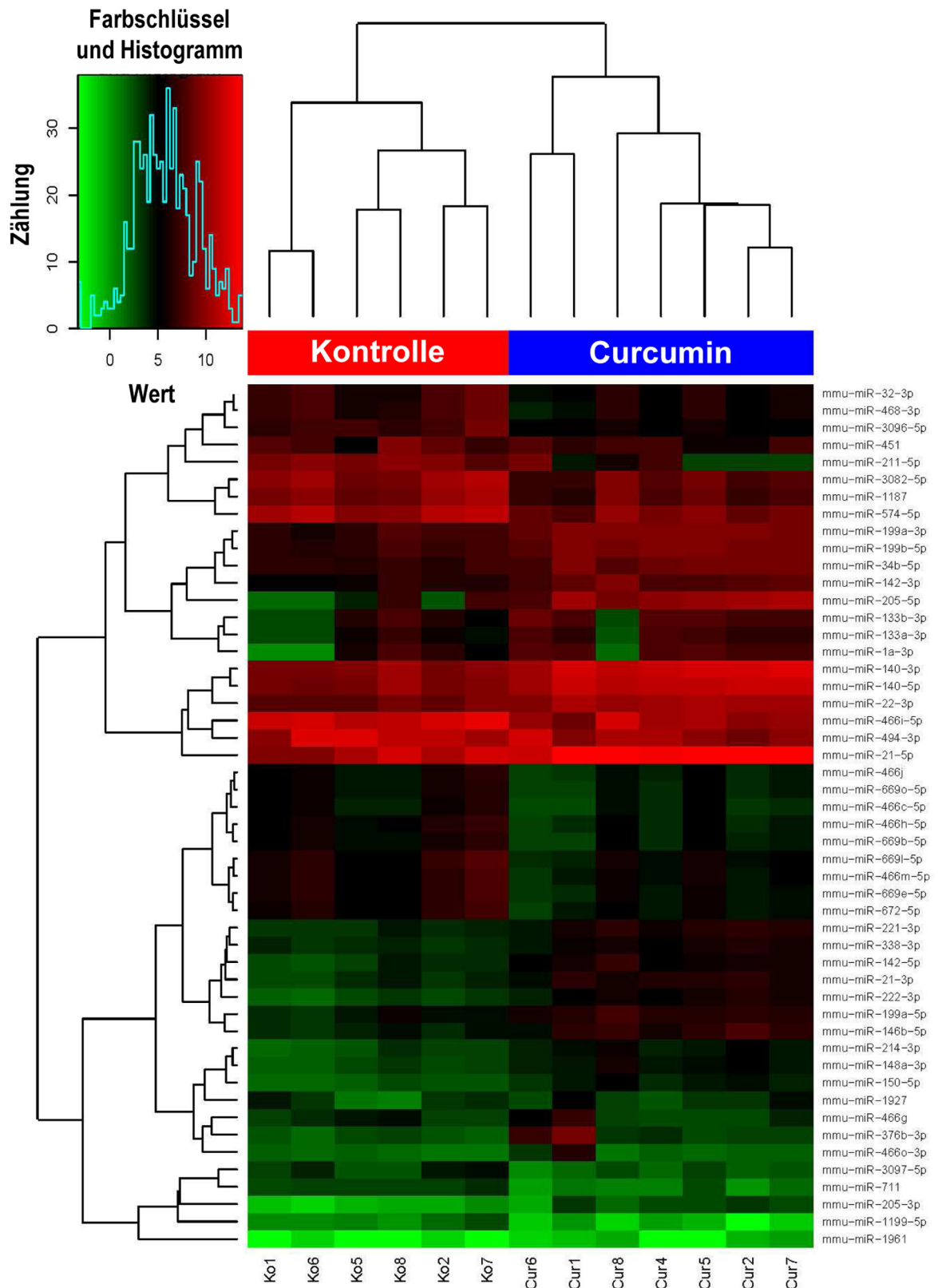


Abb. 33: Clusteranalyse des tumoralen miRNA-Profiles. Die resultierende heat-map zeigt die Expression von 50 miRNAs je nach Stärke (Zählung) in verschiedenen Farben (Wert) an (s. Farbschlüssel). Dendrogram links: Gruppierung der miRNAs, Dendrogram oben: Gruppierung der biologischen Replikate. Von Bedeutung ist die Gruppierung der Curcumin-behandelten- und Kontrolltiere in zwei separate Cluster.

Basierend auf den 50 miRNAs, deren Expressionslevel über alle Proben hinweg am stärksten voneinander variierten, wurde eine distanzbasierte, hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Diese Clusteranalyse demonstrierte eine Einteilung der Proben anhand der tumoralen miRNA-Profile in zwei Gruppen, die dem Behandlungsschema entsprachen (Abb. 33).

Die zehn am stärksten durch die Curcumin-Diät hochregulierten tumoralen miRNAs umfassten mmu-miR-205-5p, mmu-miR-222-3p, mmu-miR-205-3p, mmu-miR-146b-5p, mmu-miR-21-5p, mmu-miR-21-3p, mmu-miR-221-3p, mmu-miR-140-3p, mmu-miR-142-5p und mmu-miR-140-5p (Abb. 34 A).

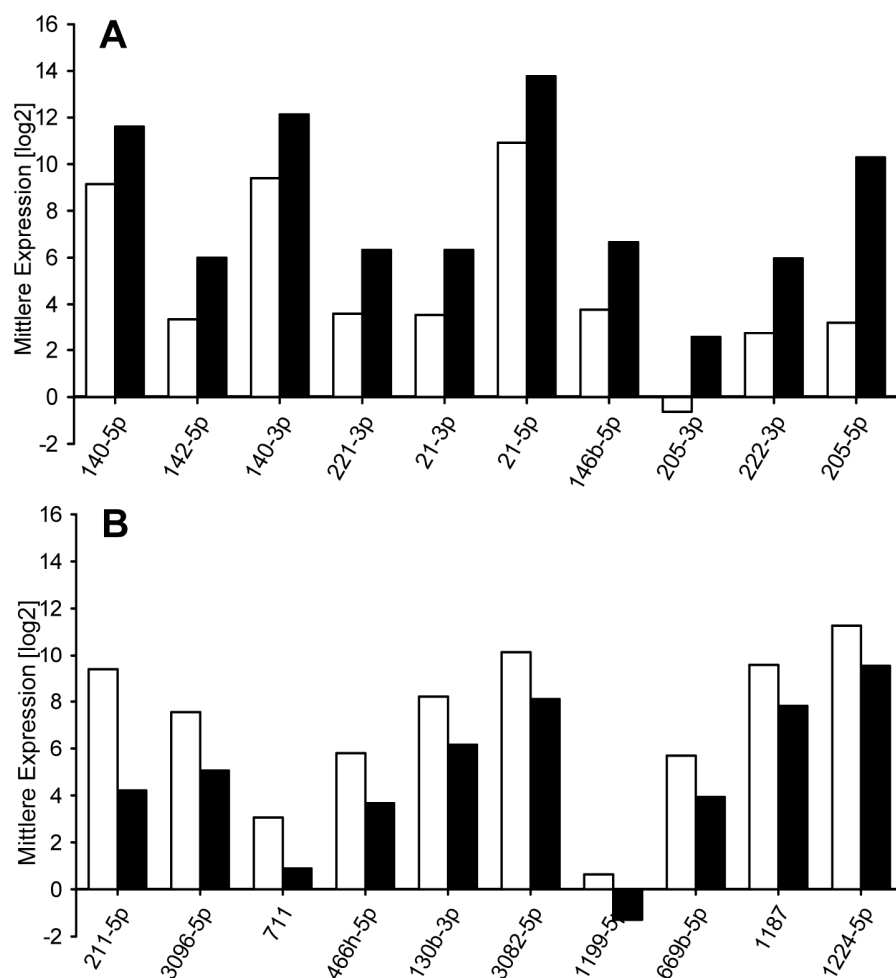


Abb. 34: Die mittlere Expression (log2) der zehn am stärksten hoch- (A) und herunter- (B) regulierten miRNAs aus den Tumoren von Kontroll- (weiße Balken) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Balken).

Die miRNAs mmu-miR-211-5p, mmu-miR-3096-5p, mmu-miR-711, mmu-miR-466h-5p, mmu-miR-130b-3p, mmu-miR-3082-5p, mmu-miR-1199-5p, mmu-miR-669b-5p, mmu-miR-1187 und mmu-miR-1224-5p gehörten zu den am stärksten herunterregulierten miRNAs (Abb. 34 B). Hierbei wurde die Expression von mmu-miR-205-5p durch die Be-

handlung mit Curcumin 135-fach erhöht. Die Expression von mmu-miR-211-5p wurde durch die Curcumin-Behandlung am deutlichsten reduziert (35-fach). Ein Großteil der getesteten miRNAs, deren Sequenz bekannt ist, zeigte sich zwischen Menschen und Mäusen hoch konserviert (*Tab. 7*).

Tab. 7: Änderung (Δ) in der Expression der am stärksten regulierten miRNAs (Unterschiede in den Sequenzen sind grau markiert):

miRNA	Δ Expression	P	Sequenz <i>Mus musculus</i>	Sequenz <i>Homo sapiens</i>
↑				
205-5p	135,506	0,025	UCCUUCAU <u>UCCACCGGAGUCUG</u>	UCCUUCAU <u>UCCACCGGAGUCUG</u>
222-3p	9,392	0,003	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
205-3p	9,137	0,010	GAUUUCAGUGGAGUGAAG <u>CUCA</u>	GAUUUCAGUGGAGUGAAG <u>UUC</u>
146b-5p	7,379	0,005	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
21-5p	7,148	0,028	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
21-3p	6,877	0,003	CAACAGCAGUCGAUGGGCUG <u>UC</u>	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
221-3p	6,658	0,004	AGCUACA <u>UUGUCUGCUGGGUUUC</u>	AGCUACA <u>UUGUCUGCUGGGUUUC</u>
140-3p	6,647	0,003	UACCACAGGGUAGAACCACGG	UACCACAGGGUAGAACCACGG
142-5p	6,217	0,005	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
140-5p	5,524	0,004	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
↓				
211-5p	0,028	0,039	UUCCCUUUGUCAUCCUUUGCCU	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU
3096-5p	0,178	0,013	UGGCCAAGGAUGAGAACU	nd
711	0,222	0,016	GGGACCCGGGGAGAGAUGUAAG	nd
466h-5p	0,229	0,049	UGUGUGCAUGUGCUUGUGUGUA	nd
130b-3p	0,242	0,013	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
3082-5p	0,242	0,036	GACAGAGUGUGUGUGUCUGUGU	nd
1199-5p	0,261	0,023	UCUGAGUCCCGGUCGCGCGG	nd
669b-5p	0,294	0,049	AGUUUUGUGUGCAUGUGCAUGU	nd
1187	0,298	0,049	UAUGUGUGUGUGUAUGUGUGUAA	nd
1224-5p	0,299	0,010	GUGAGGACU <u>GGGAGGUGGAG</u>	GUGAGGACU <u>CGGGAGGUGG</u>

Aus den am stärksten in ihrer Expression veränderten miRNAs wurden mmu-miR-205-5p ($P=0,025$), mmu-miR-205-3p ($P=0,01$), mmu-miR-142-5p ($P=0,005$) und mmu-miR-130b-3p ($P=0,013$) ausgewählt, da sie in der Tumorgenese eine hohe Relevanz besitzen. Die Expressionslevel dieser miRNAs in den Tumoren der Kontroll- und Curcumin-behandelten Tiere wurde mittels einer qRT-PCR validiert. Hierbei zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Array-ermittelten Daten und den Ergebnissen der qRT-PCR (*Abb. 35*).

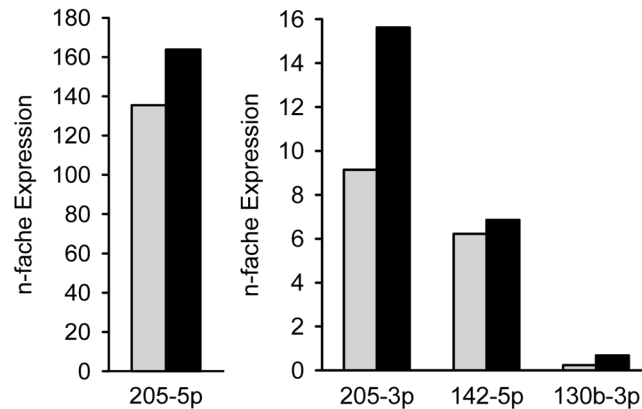


Abb. 35: Validierung der Expression relevanter miRNAs. Darstellung der vielfachen Expression von *mmu-miR-205-5p*, *mmu-miR-205-3p*, *mmu-miR-142-5p* und *mmu-miR-130b-3p* in Curcumin-behandelten Tumoren verglichen zu Kontrollen (1-fach), ermittelt durch miRNA-Array- (graue Balken) oder qRT-PCR-Analyse (schwarze Balken).

4.2.6. Expression relevanter miRNAs in Melanomzelllinien

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Applikation von 20 μ M Curcumin für 48 h auch in weiteren Melanomzelllinien die Expression der vier ausgewählten miRNAs moduliert. Neben den murinen B78H1 Zellen wurde die Expression von *mmu-miR-205-5p*, *mmu-miR-205-3p*, *mmu-miR-142-5p* und *mmu-miR-130b-3p* per qRT-PCR auch in humanen SK-Mel-28 und MeWo Zellen überprüft.

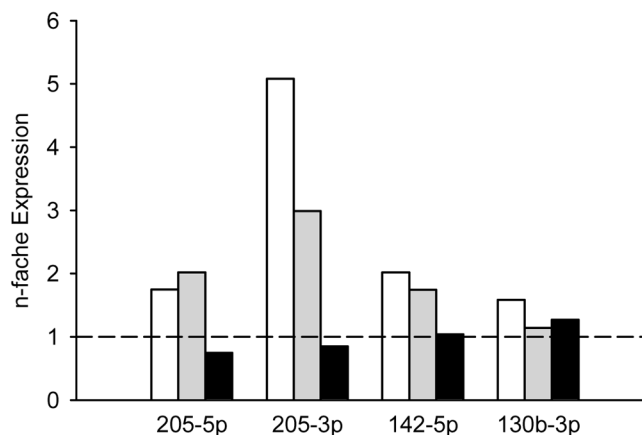


Abb. 36: Expression relevanter miRNAs in Melanomzelllinien. Vielfache Expression von *mmu-miR-205-5p*, *mmu-miR-205-3p*, *mmu-miR-142-5p* und *mmu-miR-130b-3p* in murinen B78H1 (weiße Balken), humanen SK-MEL-28 (graue Balken) und humanen MeWo (schwarze Balken) Zellen nach 48 h Inkubation mit 20 μ M Curcumin oder Vehikel (0, 1% DMSO, gestrichelte Linie).

Es zeigte sich, dass diese relevanten miRNAs in murinen B78H1 und humanen SK-Mel-28 Zellen durch Curcumin in einer vergleichbaren Weise reguliert wurden. Die

humanen MeWo Zellen hingegen, die von Melanom-Lymphknotenmetastasen abstammen, zeigten keine deutliche Regulation dieser miRNAs durch Curcumin (*Abb. 36*).

4.2.7. Putativ regulierte Signalwege

Die Auswirkungen der Curcumin-Diät auf zelluläre Signalwege, die putativ durch Curcumin-regulierte miRNAs beeinflusst werden, wurden mittels des *online tools* GeneTrail untersucht. Hierfür wurde eine Überrepräsentationsanalyse durchgeführt, die potentielle Targets der 86 hochregulierten bzw. der 49 herunterregulierten miRNAs in zellulären Signalkaskaden ermittelte. Putative Ziele der von Curcumin hochregulierten miRNAs waren in den *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*-Signalwegen Signalwegen "Biosynthese von O-Glykanen" und "Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum" zu finden sowie in verschiedenen Krebserkrankungen, wie z. B. Leukämie, überrepräsentiert (*Tab. 8*).

Tab. 8: Zelluläre Signalwege mit putativen Targets der regulierten miRNAs

KEGG Signalwege mit akkumulierten, putativen Targets	P	Erwartete Target-Anzahl	Beobachtete Target-Anzahl	n-fache Akkumulation der Targets
↑				
Muzine der Typ O-Glykanbiosynthese	0,007	15	24	1,60
Nierenzellkarzinom	0,024	37	50	1,35
Zelluläre Signalwege bei Krebs	0,026	171	198	1,16
Proteinreifung im Endoplasmatischen Retikulum	0,029	85	104	1,22
Akute myeloische Leukämie	0,029	31	42	1,35
↓				
Cholinerge Synapsen	0,021	42	58	1,38
ErbB Signalwege	0,021	34	50	1,47
Fokale Adhesion	0,021	80	102	1,28
Neuroaktive Liganden-Rezeptor Interaktion	0,021	94	117	1,24
Pankreaskrebs	0,021	29	43	1,48
Nierenzellkarzinom	0,021	28	41	1,46
Dilatierete Kardiomyopathie	0,021	31	45	1,45
Arrhythmische rechte Ventrikelkardiomyopathie	0,022	28	41	1,46
Langzeit Potenzierung	0,022	27	39	1,44
Retrograde Endocannabinoid Signalisierung	0,022	38	52	1,37
Type II Diabetes mellitus	0,022	18	28	1,56
mTOR Signalwege	0,022	26	38	1,47
Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)	0,025	30	42	1,42
Prostatakrebs	0,025	35	48	1,38
Insulin Signalwege	0,029	56	72	1,29
Neurotrophin Signalweg	0,030	48	63	1,31
Morphin Abhängigkeit	0,030	34	47	1,38
Kolorektaler Krebs	0,030	25	36	1,42
Dopaminerge Synapse	0,043	51	65	1,28

Zusätzlich wurden die *Gene-Ontology*-Stichworte „zelluläre Proliferation“, „Zelltod“ und „Regulation der Apoptose“ durch die Überrepräsentationsanalyse identifiziert.

Die vorhergesagten Ziele der von Curcumin herunterregulierten miRNAs akkumulierten in den KEGG-Signalwegen wie z. B. „mTOR“, „ErbB“ und waren assoziiert mit Pankreas-, Nieren-, Prostata- und kolorektalem Krebs (Tab. 8). Weiterhin waren putative Ziele in Signalwegen überrepräsentiert, die mit Symptomen des metabolischen Syndroms assoziiert sind, wie zum Beispiel „dilatierter Kardiomyopathie“, Diabetes Typ II oder dem Insulin-Signalweg.

4.2.8. Targets der miRNA-205-5p

Zur Beurteilung der biologischen Relevanz der miRNA-Änderungen wurde die Expression verschiedener Targets der miRNA-205-5p im Western Blot analysiert.

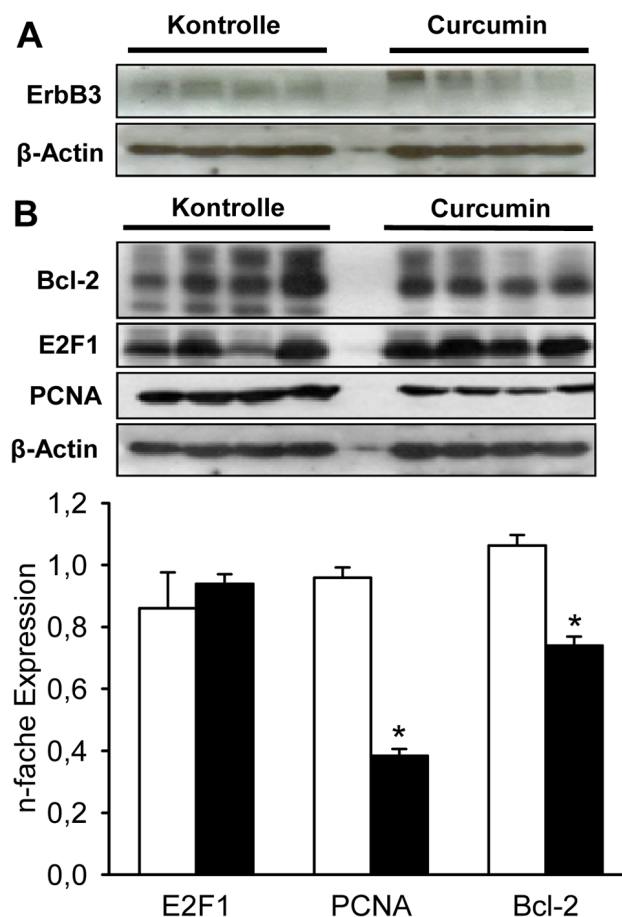


Abb. 37: Relative Expression putativer Targets von mmu-miR-205-5p in Flankentumoren. Expressionslevel von ErbB3, Bcl-2, E2F1 und PCNA in Tumoren von Kontroll- (weiße Balken, n=4) und Curcumin-behandelten Tieren (schwarze Balken, n=4). Mittelwert \pm SEM, * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (ErbB3, EGF-R 3) stellt ein validiertes Target von mir-205-5p dar und gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen. In den Tumoren der Kontrolltiere wurde ein schwaches Signal bei etwa 180 kDa detektiert, das dem phosphorylierten Monomer ErbB3 entspricht (Baselga und Swain, 2009). In den Proben der Curcumin behandelten Tiere wurde ein Signal bei deutlich über 200 kDa detektiert (Abb. 37 A).

Die Expression von Bcl-2, eines ebenfalls validierten Targets von miR-205, wurde in den Tumoren Curcumin-behandelter Tiere signifikant herunterreguliert (Curcumin: $0,74 \pm 0,03$; Kontrolle: $1,06 \pm 0,03$; $P < 0,05$) (Abb. 37 B). Im Gegensatz zu humanem Bcl-2 sind bei der Maus verschiedene *splice*-Varianten bekannt, die sich als unterschiedliche Banden im Western Blot darstellen (Abb. 37 B).

Der Gehalt an E2F1 wurde in den Tumoren hingegen nicht deutlich durch Curcumin-Diät reduziert (Abb. 37 B). Die Expression des nachgeschalteten Proliferationsmarkers PCNA lag in den Tumoren Curcumin-behandelter Tiere allerdings signifikant reduziert vor (Curcumin: $0,38 \pm 0,02$; Kontrolle: $0,96 \pm 0,03$; $P < 0,05$; relative Expression) (Abb. 37 B).

5. Diskussion

5.1. Auswirkungen pyrolytischer Prozesse auf Curcumin

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, welche Effekte haushaltsübliches Kochen auf Curcumin hat. Aus den Vorarbeiten anderer Gruppen war bekannt, dass der Gehalt an Curcumin in der getrockneten und gekochten Wurzel der Curcumpflanze im Vergleich zur rohen Wurzel verringert ist (Prathapan et al., 2009; Suresh et al., 2009). Aufgrund der Abnahme an Curcumin postulieren Suresh und Kollegen eine Verringerung der anti-oxidativen Aktivität. Allerdings wurden die Zerfallsprodukte von keiner der Gruppen näher charakterisiert. Daher wurde im Folgenden die Zusammensetzung und Aktivität der Zerfallsprodukte von Curcumin nach einer Pyrolyse-reaktion ermittelt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Vermischen von Curcumin mit Kokosfett bzw. Olivenöl, die spontane Entstehung oxidativer Curcuminprodukte bei Raumtemperatur verringert. Dies kann auf die stabilisierende Wirkung von natürlichen Ölen auf Curcumin zurückgeführt werden, wenn sie Curcumin umschließen (Bettini et al., 2013). Unabhängig vom Vorhandensein einer Fettmatrix entstanden durch die Pyrolyse hydrophilere Curcumin-, BMC- und BDMC-Isoformen, wobei etwa 30 % des Eduktes in den hier durchgeführten Versuchen umgesetzt wurden. Außerdem führte die Pyrolyse von Curcumin ohne Fettmatrix zur Formierung von Curcumin- und Dehydrocurcumin-Dimeren mit einer höheren Retentionszeit als Curcumin.

Verschiedene Untersuchungen über die Eigenschaften von Curcumin nach Erhitzen weisen auf eine Steigerung der Aktivität hin. So demonstrierten Nagabhushan und Bhide (1986) die Dosis-abhängige Reduzierung von Chili-induzierter Mutagenität durch erhitztes Curcumin. Zudem weist in Wasser erhitztes Curcumin eine erhöhte Hydrophilie sowie pharmakologische Aktivität gegen oxidierte Lipide und humane Autoantikörper *in vitro* auf (Kurien et al., 2007; Kurien et al., 2010). Weiterhin beobachteten Masuda *et al.* (1999) eine Bildung von Curcumin-Dimeren unter radikalischen Bedingungen (1 h bei 70°C mit 2,2'-Azobis(isobutyronitril)). Die Autoren diskutierten, dass die Bildung von Curcumin-Dimeren zum anti-oxidativen Potential von Curcumin beiträgt (Masuda et al., 1999).

Im Rahmen des ersten Studienabschnitts wurde auch die Aktivität der Zerfallsprodukte auf primäre Zellen und Tumorzellen untersucht. Hierfür wurde als erstes die zelluläre Absorption der Pyrolyseprodukte anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von B78H1 Zellen qualitativ beurteilt. Die mit pyrolysiertem Curcumin-behandelten B78H1 Zellen emittierten stärkere Fluoreszenzsignale als die mit unbehandeltem Curcumin inkubierten Zellen. Dies spricht für eine verbesserte zelluläre Absorption der Pyrolyseprodukte.

Dem könnte eine erhöhte Löslichkeit der pyrolysierten Derivate zu Grunde liegen, wie von Kurien *et al.* (2007) beschrieben. Eine erhöhte Hydrophilie der Pyrolyseprodukte wurde auch durch deren verringerte Retentionszeiten in der HPLC-Messung belegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde überdies zum ersten Mal gezeigt, dass Deketencurcumin als ein Hauptprodukt (ca. 10%) aus der pyrolytischen Spaltung von Curcumin entsteht. Dieses Curcuminderivat wurde bislang nur direkt aus der Pflanze isoliert oder synthetisch hergestellt (Park und Kim, 2002; Weber *et al.*, 2006; Nugroho *et al.*, 2009). Ähnlich wie Curcumin, zeigt Deketencurcumin anti-inflammatorische, anti-allergene und anti-kanzerogene Eigenschaften (Masuda *et al.*, 1993; Cen *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2009; Nugroho *et al.*, 2009; Quincoces Suarez *et al.*, 2010). Quincoces Suarez und Kollegen (2010) wiesen in Tierversuchen eine akute Toxizität von Deketencurcumin bei einer Verabreichung von 8,53 g/kg KG i.p. in Schweizer Albinomäusen nach. Eine chronische Applikation von 5 g/kg KG pro Tag für 14 Tage zeigte ebenfalls keine toxischen Effekte. Deketencurcumin wird somit als nicht-toxisch eingestuft (Quincoces Suarez *et al.*, 2010). Pharmakokinetische Studien in Ratten belegten zudem, dass Deketencurcumin eine Verdopplung der Halbwertszeit im Plasma gegenüber Curcumin aufweist und bereits ein Aktivitätsplateau bei 20 mg/kg KG zeigt (Liang *et al.*, 2009; Nugroho *et al.*, 2009). Dies sind Hinweise für eine erhöhte Plasmastabilität von Deketencurcumin verglichen mit Curcumin. Liang *et al.* (2009) begründeten diese mit der Abspaltung einer Ketengruppe. Die verbleibende Ketogruppe wird durch die benachbarten Doppelbindungen stabilisiert (Abb. 26). Eine Keto-Enol-Tautomerisierung für dieses Molekül ist daher energetisch unwahrscheinlich und die hydrolytische Degradation unter physiologischen Bedingungen, wie von Tonnesen *et al.* (1985) beschrieben, verringert. Die Abspaltung der Ketengruppe stabilisiert das Molekül potentiell auch gegen die Verstoffwechselung im Phase I- und Phase II-Metabolismus. Diese verstärkte Stabilität von Deketencurcumin geht möglicherweise mit einer verringerten anti-oxidativen Wirkung des Moleküls im Vergleich zu Curcumin einher. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass Deketencurcumin bzw. -Analoga die Schädigung von Zellen durch β -Amyloide oder Radikale nicht so effizient verhindern, wie Moleküle mit intakten bis- α,β -ungesättigten Diketogruppen (Dinkova-Kostova *et al.*, 1998; Park und Kim, 2002).

Masuda *et al.* (1993) zeigten im Mausmodell, dass Deketencurcumin anti-inflammatorisch wirkt. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden der Einfluss der Curcumin-Diät bzw. der Pyrolyseprodukte auf die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht. Dieser wird bei Entzündungsreaktionen aktiviert und in den Nukleus transloziert. Chronische Entzündungsreaktionen in Organen wie der Haut oder dem Darm gehen nicht nur mit einem großen Leidensdruck für die Patienten einher, sondern können zu kanzerogenen Veränderungen des Gewebes führen (Xu *et al.*, 1997; Plummer *et al.*, 1999; Chiu

und Su, 2009). In einer Vielzahl von Publikationen wurde die anti-inflammatorische Wirkung von Curcumin bereits beschrieben (Coban et al., 2012; Shehzad et al., 2013). Die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B in B78H1 Melanomzellen wurde in der vorliegenden Arbeit in Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei zeigten alle drei getesteten Curcuminderivate, verglichen mit den Kontrollen, eine Verringerung in der nukleären NF- κ B Konzentration und damit der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Auch in den exzidierten Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere wurde eine geringere NF- κ B Expression verglichen mit den Tumoren der Kontrolltiere nachgewiesen. Im Unterschied zu anderen Studien konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was möglicherweise an der hohen Varianz der Replikate lag.

Zur Analyse der anti-kanzerogenen Aktivität von Deketencurcumin, wurde dieses in den hier durchgeführten Versuchen an B78H1 Melanomzellen getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass Deketencurcumin konzentrationsabhängig die Viabilität von B78H1 Zellen reduziert. Hierbei zeigte sich Deketencurcumin potenter als unpyrolysiertes Curcumin. Weiterhin induzierte Deketencurcumin konzentrationsabhängig Apoptose in den Tumorzellen, wobei es ebenfalls in niedrigeren Konzentrationen aktiv war als Curcumin. In primären humanen PBMCs wies Deketencurcumin hingegen eine geringere Zytotoxizität als Curcumin auf. Verglichen mit Curcumin beobachteten auch Cen *et al.* (2009) verstärkte zytotoxische Effekte von Deketencurcumin auf humane Colonkarzinomzellen, aber geringere auf primäre humane Fibroblasten. Quincoces Suarez und Kollegen (2010) testeten die Zytotoxizität von Deketencurcumin gegen humane Darmkrebszellen bzw. murine B16F10 Melanomzellen und wiesen eine spezifische Aktivität von Deketencurcumin gegen humane Colonkarzinomzellen nach. Diese Resultate lassen auf eine spezifische Zytotoxizität von Deketencurcumin gegen Tumorzellen, insbesondere des Darms, schließen. Kunwar *et al.* (2008) beschreiben eine verstärkte Aufnahme von Curcumin durch Tumorzellen verglichen mit normalen Zellen. Die Autoren führten dies auf Unterschiede in der Lipid- und Proteinzusammensetzung der Zellmembran zurück (Kunwar et al., 2008). Möglicherweise kann Deketencurcumin noch effizienter an die Zellmembranen von Tumorzellen binden und weist infolgedessen eine höhere und spezifischere Toxizität als Curcumin auf.

Abschließend wurde im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu den zytotoxischen Effekten von Deketencurcumin Zellzyklusanalysen durchgeführt. In diesen Experimenten konnte erstmalig gezeigt werden, dass Deketencurcumin in B78H1 Melanomzellen einen G2-Arrest induziert. Eine p53-abhängige Induktion des G2-Arrests wurde ebenfalls für Curcumin und andere Curcuminderivate beschrieben (Luthra et al., 2009; Liu et al., 2012).

5.2. Effekte von diätischem Curcumin auf Melanome

Aufgrund hoher Rezidivraten und der Entstehung von Resistenzen besteht ein großer Bedarf an Alternativen zu den bestehenden Therapien des malignen Melanoms. Krebs zeichnet sich durch ein unkontrolliertes Wachstum entarteter Zellen aus und die Inhibition des Tumorwachstums ist ein zentrales Ziel in der Krebstherapie (Hanahan und Weinberg, 2011). Curcumin ist für seine anti-proliferative Aktivität bekannt. In mehreren Studien wurde zudem gezeigt, dass Curcumin Entzündungsreaktionen vermindert und der Entstehung von Tumoren in der Haut vorbeugt. Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von diätischem Curcumin auf Pathomechanismen des malignen Melanoms in der Maus untersucht. Hierbei stand die Analyse des miRNA-Netzwerkes im Mittelpunkt.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Tumoren wurden als Tumorzellsphäroide in die Rückenhautkammer von Mäusen transplantiert oder durch Injektion von Zellen in die Flanke erzeugt. Da diese Ansätze keine Transformation von normalen Zellen in Tumorzellen (Tumorinitiation) beinhalteten, sind die vorliegenden Ergebnisse weniger für die primäre Krebsprävention, als für die Tumorthherapie und sekundäre Prävention von Interesse. Aufgrund der begrenzten Studiendauer wurde zudem eine hohe Curcumin-Dosis verabreicht, die etwa viermal so hoch war, als in vergleichbaren *in vivo* Studien (Limtrakul et al., 1997; Kumar et al., 2012). Die verabreichte Menge an Curcumin entsprach damit einer therapeutischen Dosis. Um die chemopräventiven Eigenschaften von Curcumin zu untersuchen, sollten niedrig-Dosis-Versuche über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, die eine Tumorinitiation von gesunden Zellen durch chemische oder radioaktive Noxen einschließen.

Der Effekt von oral appliziertem Curcumin auf Tumorsphäroide wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst im Rückenhautkammermodell der C57BL/6 Maus untersucht. Dieses Modell ist für verschiedene Nager etabliert und gestattet die repetitive Untersuchung transplantierter Gewebe und implantierter Biomaterialien (Menger, 2002; Laschke, 2007). Dabei können über 14 Tage hinweg kontinuierlich Verlaufsdaten zu Tumorwachstum und -vaskularisierung erfasst (Menger et al., 2002). Weiterhin wurde die Wirkung von diätischem Curcumin auf das Tumorwachstum und das tumorale miRNA-Profil im Flankenmodell in C57BL/6 Mäusen untersucht. Repetitive Untersuchungen mit hochauflösendem Ultraschall ermöglichten auch hier eine kontinuierliche Aufzeichnung der Tumorgöße. Im Flankenmodell konnten der Beobachtungszeitraum und die Zeitspanne, in der die Curcumin-Diät verabreicht wurde, um 14 Tage verlängert werden. Außerdem konnte genug Probenmaterial für Micro-Array-, Western Blot- sowie immunhistochemische Analysen gesammelt werden.

In den hier dargestellten Experimenten wurde nachgewiesen, dass die Curcumin-Diät sowohl im Rückenhautkammer- als auch im Flankenmodell das Tumorstadium deutlich reduziert. Die verringerte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den Rückenhautkammertumoren bzw. von PCNA in den Flankentumoren bestätigte die anti-proliferative Wirkung der Curcumin-Diät. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche die proliferationshemmende Wirkung von Curcumin in verschiedenen Hautkrebsmodellen aufzeigen. Limtrakul *et al.* (1997) demonstrierten zum Beispiel den chemopräventiven Effekt von 1 % diätischem Curcumin gegen 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen-induzierte Hauttumoren über einen Zeitraum von 26 Wochen. Die Curcumin-Behandlung reduzierte die Anzahl der erkrankten Tiere um etwa 10 % und das mittlere Tumorstadium um mehr als 80 %. Odote und Kollegen (2004) zeigten an einem Flankenmodell mit Doxorubicin-resistenten B16F1 Melanomzellen die inhibitorische Wirkung von 25 mg/kg i.p. appliziertem Curcumin. Auch für Plattenepithelkarzinomzellen ist die proliferationshemmende Wirkung von Curcumin (15 mg/kg KG p.o.) nachgewiesen (Phillips *et al.*, 2011).

Zusätzlich deutete die verringerte Expression von Bcl-2 im aktuellen Flankenmodell auf pro-apoptotische Effekte der Curcumin-Diät hin. Eine Induktion der Apoptose wurde in den Rückenhautkammertumoren anhand einer Färbung gegen cleaved-Caspase-3 analysiert, wobei keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden. Auch wenn andere Arbeitsgruppen die Induktion von Apoptose über Caspase-3 als einen Wirkmechanismus von Curcumin identifizierten, trug diese im Rückenhautkammermodell nicht wesentlich zur Reduktion des Tumorstadiums bei (Kumar *et al.*, 2012; Thakkar *et al.*, 2013). Die Tumorstadium wurde hier vornehmlich durch eine Inhibition der Zellproliferation verringert.

Nach Hanahan und Folkman (1996) erfordert die Proliferation von Tumoren ab einer Größe von 0,4 mm das Wachstum neuer Blutgefäße (Neoangiogenese), um die Versorgung der Tumorzellen zu gewährleisten. Die Inhibition der Neoangiogenese ist ein weiterer Ansatz in der Krebstherapie (Hanahan und Folkman, 1996). Curcumin und synthetische Curcumin-derivate wurden auch als anti-angiogene Substanzen beschrieben, die z.B. eine signifikante Hemmung der Angiogenese in der Mauscornea oder B16F10-Melanomen induzieren (Arbiser *et al.*, 1998; Leyon und Kuttan, 2003). Eine Reduktion der vaskulären Dichte durch Curcumin ist ebenfalls für kolorektale Tumoren und Melanommetastasen bekannt (Kunnumakkara *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011).

Im hier dargestellten Rückenhautkammermodell konnte etwa 7 Tagen nach Transplantation der Tumorsphäroide ein erster Rückgang in der Mikrogefäßdichte nachgewiesen werden. Dies dokumentierte einen frühen inhibitorischen Effekt der Curcumin-Diät auf die Tumoren. Immunhistochemische Endpunktanalysen belegten zudem eine signifikante

Reduktion der mikrovaskulären Dichte anhand immunhistochemischer Färbungen gegen CD31. Im Gegensatz hierzu fand sich im Flankenmodell keine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Dichte. Dies bedeutet nicht zwingend, dass eine reduzierte Wirksamkeit der Diät oder eine Adaption der Tumoren vorliegt. Vielmehr könnte sich die Zahl der Tumorzellen in direkter Relation zum Verlust des unterstützenden Blutgefäßnetzwerkes verringert haben, so dass die mikrovaskuläre Dichte konstant blieb. Dieser Effekt wurde als *shrink-to-fit-theory* von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Hlatky et al., 2002; Nico et al., 2008). Hierfür spricht auch die beobachtete, starke Hemmung der Tumorzellproliferation. Um aufzuklären, ob zentrale Mechanismen in der Angiogenese durch eine verlängerte Curcumin-Diät gehemmt werden, könnte zusätzlich die Expression von endothelialen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren wie VEGF oder HIF-1 α überprüft werden. Die Reduktion dieser angiogenen Faktoren durch Curcumin ist für verschiedene humane Krebszelllinien sowie Lungen- und Lebertumoren in Nagern bereits beschrieben (Thomas et al., 2008; Tung et al., 2011; Huang et al., 2013).

MiRNAs regulieren etwa die Hälfte aller Gene und spielen eine zentrale Rolle in der Tumorgenese (Esquela-Kerscher und Slack, 2006). Daher werden miRNAs als vielversprechende therapeutische Targets und potentielle Biomarker für Krebserkrankungen angesehen (Fichtlscherer et al., 2011). MiRNAs wurden ebenfalls im Rahmen der Progression maligner Melanome als de-reguliert beschrieben (Sand et al., 2012; Xu et al., 2012).

In der vorliegenden Dissertation konnte demonstriert werden, dass die Einnahme von Curcumin das globale Expressionsprofil der miRNA in Melanomen modifiziert. Basierend auf den Expressions-Daten der miRNAs aus einer Hochdurchsatz Array-Analyse der Tumoren wurde eine hierarchische Clusteranalyse (*complete linkage hierarchical clustering*) durchgeführt. Die Clusteranalyse zeigte, dass beruhend auf der jeweiligen Diät eine Zuordnung der biologischen Replikate in zwei Gruppen möglich ist. Auf diese Weise wurde die grundlegende Änderung des tumoralen miRNA-Profiles durch diätisches Curcumin veranschaulicht. Auch für andere Nahrungsmittel, wie Spinat oder Knoblauch, wurde der Einfluss spezieller Diäten auf die Expression anti-proliferativer und anti-inflammatorischer miRNAs in Biopsien von Darmtumoren bzw. infiziertem Darmgewebe nachgewiesen (Al-Quraishy et al., 2011; Parasramka et al., 2012). Diese und weitere Studien demonstrierten, dass Nährstoffe die miRNA-Profile im Gewebe verändern und sie als prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf pflanzliche und synthetische Tumortheraeutika dienen können (Ohuchida et al., 2011; Izzotti et al., 2012).

Die *top ten* der signifikant durch die Curcumin-Diät hochregulierten miRNAs beinhalteten mmu-miR-205-5p, mmu-miR-205-3p und mmu-miR-142-5p. Unter den am stärksten in der Expression reduzierten miRNAs befand sich mmu-miR-130b-3p. *In silico*

Target-Analysen und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuteten auf eine hohe Relevanz dieser miRNAs im Rahmen der anti-kanzerogenen Wirkung von Curcumin hin. Aus diesem Grund wurden die Expressionslevel dieser miRNAs in den Tumoren zusätzlich durch qRT-PCR bestätigt. Die Expression von mmu-miR-130b-3p durch die Curcumin-Diät signifikant reduziert. Die korrespondierende hsa-miR-130b-3p wurde in Patientenproben des kutanen malignen Melanoms verglichen mit unverändertem Gewebe als überexprimiert beschrieben (Sand et al., 2012). Weiterhin wurde für Prostatakrebszellen eine Überexpression von hsa-miR-130b-3p in Kombination mit einer reduzierten Expression an hsa-miR-205 und hsa-miR-222 beobachtet (Jung et al., 2010). Auch in Tumoren des Endometriums und des Darmes wurde eine Hochregulation der hsa-miR-130-3b beschrieben, deren Überexpression mit einer Induktion der EMT und Neoangiogenese assoziiert ist (Colangelo et al., 2013; Li et al., 2013). Damit stellt die miR-130b ein vielversprechendes Target für die Krebstherapie dar.

Mmu-miR-142-5p wurde im aktuellen Modell durch die Curcumin-Diät überexprimiert. Eine Herunterregulation der hsa-miR-142-5p ist mit einer verringerten Überlebensrate bei Patienten mit Magen- bzw. Pankreaskrebs assoziiert und wird als prognostischer Marker diskutiert (Ohuchida et al., 2011; Zhang et al., 2011). Eine Vorhersage putativer Targets für hsa-miR-142-5p umfasste verschiedene Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sowie die Onkogene KIT und VAV3 (s. Datenbank *mirbase* (Griffiths-Jones S, 2006)). Weitere Zielproteine dieser miRNA fanden sich in den Signalwegen verschiedener Krebsarten sowie der Melanogenese (s. Datenbank *DianaLab* (Reczko M, 2012)).

MiR-205 wurde in der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie durch die Curcumin-Diät 135-fach hochreguliert wurde und eine verminderte Expression dieser miRNA mit der Progression von Melanomen assoziiert ist (Liu et al., 2012). Ebenso wie die, den *top ten* zugehörigen, miR-146b-5p, -140-5p, -140-3p, -211-5p und -1224-5p, liegt die miR-205 in unterschiedlichen Krebsarten entweder über- oder unterexprimiert vor (Iorio et al., 2007; Hurst et al., 2009; Lin et al., 2011; Tan et al., 2011; Geraldo et al., 2012; Liu et al., 2012; Mosakhani et al., 2012; Noguchi et al., 2013). Noguchi et al. (2013) zählten die in caninen und humanen Melanomen unterexprimierte miR-205 jedoch zu den wichtigsten der anti-kanzerogenen miRNAs. Sie konnten belegen, dass die Überexpression von miR-205 das Wachstum von humanen Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* (*Xenografts* in Mäusen) inhibiert, wobei die Expression von E2F1, VEGF und BCL-2 reduziert wird (Noguchi et al., 2013). Dar und Kollegen (2011) bringen die tumorsuppressive Aktivität von miR-205 in Melanomzellen vor allem mit einer verminderten Expression der Transkriptionsfaktoren E2F1 und E2F5 und der nachgeschalteten AKT-Signaltransduktionskaskade in Verbindung (Dar et al., 2011). Die miR-205 liegt in

malignen Melanomzellen, verglichen mit benignen, 100-fach unterexpressiert vor, so dass sie sich als prognostischer Marker von Melanomen eignet (Xu et al., 2012). Die Expression von hsa-miR-205 ist ebenfalls in Krebszellen anderer Entitäten reduziert und wurde als Marker für die Aggressivität der Erkrankung diskutiert (Vera et al., 2013; Verdoodt et al., 2013; Wang et al., 2013). MiR-205-5p und -3p spielen überdies eine zentrale Rolle in der Umkehrung der EMT in Tumorzellen (Gregory et al., 2008; Greene et al., 2010). Die Expressionssteigerung der miR-205 ist ein Schlüsselfaktor in der Reversion der EMT und trägt wahrscheinlich zur anti-kanzerogenen Aktivität von Curcumin bei. Bezüglich der Regulation von miR-205 ist bekannt, dass das Gen auf Chromosom 1q (1q32.2) lokalisiert ist. Dem miR-205-Gen ist ein Promotorbereich vorgeschaltet, der unter anderem in Blasenkrebs als hypermethyliert beschrieben wurde. Dies führt zur epigenetischen Stumm-schaltung der miRNA-205 (s. Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>; (Wiklund et al., 2011)). Shu *et al.* (2011) wiederum zeigten, dass Curcumin als DNA-Methyltransferase-Inhibitor agiert. Auf diese Weise wurden hyper-methylierte Promotorbereiche z.B. in Prostatakrebszellen de-methyliert, was zur erneuten Expression vormals stummgeschalteter Gene führt (Shu et al., 2011). Dies könnte auch ein möglicher Mechanismus zur Wiederherstellung der Expression von miR-205 durch Curcumin in den Flankentumoren sein.

Einige der am stärksten in ihrer Expression veränderten miRNAs wurden, verglichen mit den Vorarbeiten anderer Gruppen, unerwartet durch die Curcumin-Diät reguliert. Die vorliegenden Daten belegten z.B. eine deutliche Hochregulation der mmu-miR-221-3p und -222-3p in den Tumoren Curcumin-behandelter Tiere. Die Überexpression dieser miRNAs ist mit der Progression von Melanomen, Brustkrebs und Glioblastomen assoziiert, wobei die Expression des Zellzyklus-Regulators p27 (Kip1) verringert und die Zellproliferationsrate gesteigert ist (Mercatelli et al., 2008; Liu et al., 2012). Mehrere Arbeitsgruppen bringen die Überexpression von miR-211 außerdem mit der Progression von Melanomen in Verbindung (Mazar et al., 2010; Sakurai et al., 2011; Xu et al., 2012). Die Überexpression von mmu-miR-221, -222 und -211 nach oraler Curcumin-Applikation könnte das Resultat einer Rückkopplungsreaktion der Tumorzellen sein, mit der diese auf die Therapie reagieren. MiRNAs sind Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerkes, deren Expression abhängig von der Zellätiologie und dem experimentellen Aufbau sind (Lu et al., 2005; Gurtan und Sharp, 2013). So wurde zum Beispiel eine reduzierte Expression von miR-21 in humanen Pankreas-, Ösophagus- und Prostatakrebszellen nach einer Behandlung mit Curcumin beschrieben (Ali et al., 2010; Bao et al., 2011; Bao et al., 2012; Subramaniam et al., 2012). Sun und Kollegen (2008) fanden jedoch eine leichte Hochregulation der miR-21 nach einer Inkubation von humanen Pankreaszellen mit Curcumin, vergleichbar mit den hier vorgestellten Ergebnissen. In den Versuchen wurden nicht nur

verschiedene Zelllinien, sondern auch unterschiedliche Curcumin-Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet. Ein weiterer Grund für widersprüchliche Ergebnisse könnte eine Überlappung der regulatorischen Aktivität verschiedener miRNAs, aufgrund einer hohen Sequenzkomplementarität für dasselbe Target, sein. In den hier gezeigten Ergebnissen trifft dies wahrscheinlich für die Regulation von E2F1 bzw. PCNA zu. Des Weiteren ist für einige miRNAs beschrieben, dass diese die Translation von Targets hochregulieren, wenn die Zellen sich im Zellzyklusarrest befinden. In proliferierenden Zellen hemmen hingegen die dieselben miRNAs ihre Targets (Vasudevan et al., 2007). Sowohl let-7 als auch miR-34 können, je nach Zellzyklusphase, pro- oder anti-apoptotisch wirken (Gurtan und Sharp, 2013). Da die Curcumin-Diät in den hier durchgeführten Experimenten die Tumorzellproliferation deutlich inhibierte, wurde ein heterogenes miRNA-Profil erfasst, dass sich sowohl aus proliferierenden als auch aus ruhenden Zellen zusammensetzte. Die komplexe Regulation des miRNA-Netzwerkes kann also zu augenscheinlich widersprüchlichen und vielschichtigen Ergebnissen führen, deren Überprüfung eine technische Herausforderung darstellt (Gurtan und Sharp, 2013). Obwohl die orale Gabe von Curcumin in der Gesamtbilanz tumor-suppressiv wirkt, sollte daher der Effekt jeder einzelnen miRNA auf das Tumorstadium verifiziert werden. Da dies im Rahmen dieser Arbeit nicht bewerkstelligt werden konnte, wurde die Expression validierter miRNA-Targets nachfolgend nur für eine ausgewählte miRNA überprüft.

Um die biologische Signifikanz der Änderung des tumoralen miRNA-Profiles durch die Curcumin-Diät zu beurteilen, wurden potentielle Targets in zellulären Signalwegen mit Hilfe der Internetanwendung „GeneTrail“ ermittelt. Hierfür wurde jeweils eine ORA für alle 86 durch die Curcumin-Diät hochregulierten miRNAs, und eine für die 61 herunterregulierten miRNAs durchgeführt. Auf diese Weise wurden zelluläre Signalwege identifiziert, in denen die regulierten Targets überrepräsentiert vorlagen und die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Curcumin-Diät beeinflusst wurden. Vorhergesagte Targets der von Curcumin induzierten miRNAs befanden sich in unterschiedlichen metabolischen Signalwegen, wie dem Insulin-Signalweg, oder waren mit der Koronaren Herzkrankheit und verschiedenen Neuropathologien assoziiert. Dies indizierte eine potentielle Rolle für Curcumin zur Kontrolle des Metabolischen Syndroms. Putative Targets der durch Curcumin hochregulierten miRNAs akkumulierten z.B. in den KEGG Signalwegen der O-Glykan-Biosynthese, der Proteinreifung im endoplasmatischen Retikulum sowie in verschiedenen Krebs-assoziierten Signalwegen. Zusätzlich wurde eine Überrepräsentation z. B. für die Stichworte „zelluläre Proliferation“, „Zelltod“ und „Regulation der Apoptose“ in der *Gene Ontology* gefunden. Putative Ziele der durch Curcumin herunterregulierten miRNAs akkumulierten hauptsächlich in den Signalkaskaden „mTOR“ und „ErbB“ und Krebs-assoziierten Signalwegen. Die Akkumulation putativer Targets in diesen Signalwegen spricht für

eine entscheidene Rolle der miRNA-Regulation in der anti-kanzerogenen Aktivität von Curcumin.

Im Anschluss an die *in silico* Target-Analysen wurde die Expression sowohl putativer als auch bereits validierter Targets der mmu-miR-205-5p im Western Blot-Verfahren überprüft. Diese Targets schlossen neben CD31 auch den Transkriptionsfaktor E2F1, der unter anderem die Expression von PCNA steuert, anti-apoptotisches Bcl-2 sowie den Rezeptor ErbB3 für Wachstumsfaktoren ein. In den Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere lag die Expression von Bcl-2 signifikant reduziert vor ($P < 0,05$). Die Expression des Targets E2F1 hingegen wurde nicht nachweislich durch die Curcumin-Diät beeinflusst. Die Datenbank TargetScan (http://www.targetscan.org/mmu_50/) gibt neben miR-205 auch mmu-miR-20a und -b als potentielle Regulatoren von E2F1 an. Diese wurden in den aktuellen Daten durch die Behandlung mit Curcumin signifikant herunterreguliert (s. Anhang, Tab. 9). Die Curcumin-Diät regelte in diesem Falle also potentielle Effektoren des Transkriptionsfaktors E2F1 auf gegenteilige Weise. Im Folgenden wurde auch der Gehalt an PCNA überprüft, dessen Expression durch den Transkriptionsfaktor gesteuert wird. Interessanterweise war PCNA signifikant in den Tumoren der Curcumin-behandelten Tiere reduziert ($P < 0,05$). Dies deutet darauf hin, dass PCNA auch durch weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die miR-205-regulierten E2F3 oder E2F5, beeinflusst oder durch andere miRNAs reguliert wird. Hierfür käme z.B. die durch Curcumin überexprimierte mmu-miR-222 in Frage, die ein potentieller Regulator von PCNA ist.

Ein weiteres validiertes Target von mir-205-5p stellt ErbB3 dar (Wang et al., 2013). ErbB3 gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen und leitet als Heterodimer mit ErbB2 bzw. ErbB4 Signale zur Zelldifferenzierung, Proliferation sowie Migration weiter (Buac et al., 2009; Choi et al., 2012). Daher stellen diese Rezeptoren attraktive Targets in der Krebstherapie dar (Burgess, 2008). Sowohl die Amplifikation des kodierenden Gens, als auch die Überexpression des Rezeptors, sind für Krebsarten unterschiedlicher Ätiologie, wie z.B. der Brust, Blase oder Prostata, beschrieben (Greene et al., 2010; Koumakpayi et al., 2010; Choi et al., 2012). Auch im Melanom spielt ErbB3 eine zentrale Rolle in der Induktion der Proliferation, EMT und der Tumorevasion gegen Kinase-Inhibitoren (Buac et al., 2009; Abel et al., 2013). Die Expression von ErbB3 wurde in den hier beschriebenen Experimenten mittels Western Blot-Analyse untersucht. In den Kontrolltumoren fand sich ein schwaches Signal bei etwa 180 kDa, was dem phosphorylierten Monomer ErbB3 in seiner aktivierten Konfiguration entspricht. In den Curcumin-behandelten Tumoren war dieses Signal nicht erkennbar, sondern ein stärkeres bei etwa 250 kDa, welches mit dem dimerisierten Rezeptor übereinstimmt. Eine Heterodimerisierung mit ErbB1, 2 oder 4 würde mit einer Signaltransduktion und einer potentiellen Induktion der Proliferation einhergehen (Baselga und Swain, 2009). Die Heterodimerisierung des Rezeptors wäre in

diesem Falle ein Hinweis auf eine mögliche Evasion des Tumors gegenüber der Therapie mit Curcumin. Eine Homodimerisierung, die ebenfalls zu einer Intensivierung des Western Blot-Signals bei 250 kDa führen würde, wäre hingegen ein Zeichen für die therapeutisch angestrebte Blockade der Signalkaskade, da ErbB3 selbst keine Kinase-Aktivität besitzt (Baselga und Swain, 2009). Um dies zu untersuchen, sollte eine mögliche Co-Expression von ErbB3 mit ErbB1, 2, bzw. 4 sowie die Aktivität von nachgeschalteten MAP-Kinasen in den Tumoren überprüft werden. Da diese funktionellen Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, bleibt offen, ob Curcumin in diesem Modell zu einer Deaktivierung der ErbB-Signalkaskade führte oder nicht.

Neben der biologischen Bedeutsamkeit der miRNA-Regulation durch Curcumin stellte sich auch die Frage nach einer Übertragbarkeit dieser Resultate auf andere Tumor-entitäten sowie Tumorerkrankungen im Menschen. Wie schon beschrieben wurden die stark regulierten miRNAs mmu-miR-205-5p, -3p, mmu-miR-142-5p und mmu-miR-130b-3p aufgrund ihrer Relevanz auch für andere Tumorerkrankungen als das maligne Melanom, wie Brust- und Pankreaskrebs, näher untersucht. Um die Translation auf weitere Melanomzellen zu überprüfen, wurden die Expressionsniveaus dieser miRNAs in murinen B78H1, humanen SK-Mel-28 und humanen MeWo Zellen nach einer Inkubation mit Curcumin überprüft. In den hier durchgeführten Experimenten induzierte Curcumin höhere Expressionslevel dieser miRNAs in B78H1 und SK-Mel-28 Zellen. Entsprechend den Angaben von Smalley *et al.* (2008) tragen SK-Mel-28 Zellen homozygot eine BRAF V600E Mutation, wie sie in etwa 50 % aller kutanen Melanome zu finden ist. Diese führt zur konstitutiven Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweges und damit zu einer unkontrollierten Zellproliferation (Smalley *et al.*, 2008; Sosman *et al.*, 2012). Aufgrund der schnell auftretenden Resistenzen maligner Melanome gegen spezifische Kinase-Inhibitoren wie Ipilimumab wird von Kudchadkar *et al.* (2012) eine Kombinations-therapie mit unterschiedlichen Inhibitoren vorgeschlagen. Als pan-Kinase-Inhibitor stellt Curcumin einen möglichen Kandidaten hierfür dar (Shehzad *et al.*, 2013). Auch die vergleichbare Regulation der relevanten miRNAs in B78H1 und SK-Mel-28 Zellen deutet auf einen potentiellen Nutzen von Curcumin für die Therapie humaner Melanome hin.

Die ebenfalls in den aktuellen Versuchen getesteten humanen MeWo Zellen reagierten dagegen nur schwach auf die Inkubation mit Curcumin. MeWo Zellen leiten sich von Lymphknotenmetastasen von Melanomen ab. Es wurde gezeigt, dass das miRNA Profil primärer Melanome sich von metastatischen unterscheidet, was eine Erklärung für Unterschiede in der Regulation der miRNAs durch Curcumin in den verschiedenen Zelllinien sein könnte (Poliseno *et al.*, 2012; Sand *et al.*, 2012).

5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit, wurde getestet, welche Effekte pyrolytische Prozesse auf Curcumin haben. Die hierbei entstandenen Pyrolyseprodukte wiesen eine stärkere Hydrophilie, verbesserte Aufnahme durch Tumorzellen und erhöhte intrazelluläre Stabilität auf. Der Einfluss von Fetten auf die pyrolytische Zersetzung von Curcumin war gering. Es konnte gezeigt werden, dass Fette hierbei die Entstehung anti-oxidativer Dimere verhindern. Pyrolysiertes Curcumin und speziell das Derivat Deketencurcumin, welches zum ersten Mal aus pyrolysierten Proben isoliert wurde, zeigten eine verstärkte anti-kanzerogene Aktivität verglichen mit Curcumin. Dies lässt darauf schließen, dass eine haushaltübliche Verarbeitung durch Kochen die anti-kanzerogenen Effekte von Curcumin verbessert (Abb. 38).

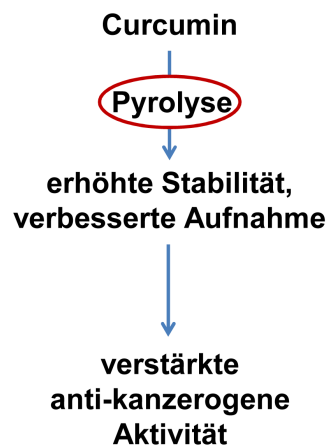


Abb. 38: Verbesserung der anti-kanzerogenen Aktivität von Curcumin durch pyrolytische Prozesse.

Diese Hypothese soll in zukünftigen *in vivo* Studien untersucht werden. In diesen soll das Hauptprodukt der Pyrolyse, Deketencurcumin, als Futterzusatz verabreicht und der Effekt auf das Tumorwachstum in der Maus überprüft werden. Des Weiteren soll ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen der anti-kanzerogenen Wirkung von Deketencurcumin und der Regulation der miR-205 analysiert werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein regulativer Effekt von diätischem Curcumin auf das miRNA-Profil transplanteder muriner Melanome nachgewiesen. Es wurde sowohl die Expression von Oncomiren als auch von anti-kanzerogenen miRNAs modifiziert. Hierbei muss die 135-fache Hochregulation der miRNA-205 durch Curcumin hervorgehoben werden, da die Repression der miRNA-205 in der molekularen Pathogenese des malignen Melanoms eine zentrale Rolle spielt. Target-Analysen belegten zudem eine Verminderung der Zellproliferation und Zellviabilität durch die Curcumin-Diät (Abb. 39).

Um die Signifikanz dieser Resultate zu belegen, soll die am stärksten induzierte miRNA, mmu-miR-205-5p, in Folgeuntersuchungen gehemmt werden. Daraufhin sollen die anti-proliferativen Effekte von Curcumin erneut überprüft werden. Ein weiterer Fokus soll auf einer möglichen Reversion der EMT liegen, die anhand der Expression von E-cadherin oder der ErbB-Signalkaskaden als Marker überprüft werden kann.

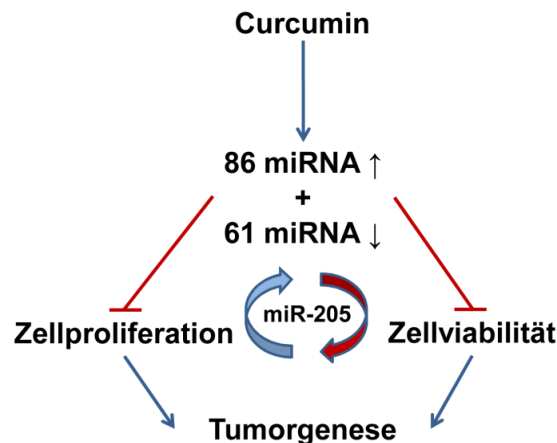


Abb. 39: Potentielle Rolle Curcumin-induzierter miRNAs in der anti-kanzerogenen Aktivität von diätischem Curcumin.

Obwohl die krebshemmenden Effekte von Curcumin und Curcuminderivaten bereits vielfach beschrieben wurden, wird dieses pflanzliche Polyphenol nicht in der Tumorthherapie eingesetzt. Dies liegt vor allem an der geringen Bioverfügbarkeit, die den Einsatz verglichen mit potenteren Chemotherapeutika wenig erfolgversprechend macht. Es ist allerdings bekannt, dass Curcumin bzw. Curcuminderivate in Kombination mit zugelassenen Chemotherapeutika deren Potenz erhöhen (Ali et al., 2010; Bayet-Robert et al., 2010). Eine mögliche Senkung der chemotherapeutischen Dosis wäre hierbei mit einer Steigerung der Lebensqualität der Patienten verbunden. Da Curcumin auf mehreren Ebenen anti-kanzerogen wirkt, wird auch die Wahrscheinlichkeit der Entstehung resistenter Tumoren vermindert. Zudem verdeutlichen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass oral verabreichtes Curcumin molekulare Pathomechanismen in Tumoren, wie das miRNA-Netzwerk, reguliert. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der miRNAs zwischen den Spezies, zeigen die hier im Mausmodell erhobenen Daten durchaus Relevanz für die Humanmedizin (Izzotti et al., 2012). Aus diesen Gründen wäre ein kombinatorischer Einsatz von Curcumin bzw. potenteren Curcuminderivaten, wie Deketencurcumin, mit bewährten Chemotherapeutika vielversprechend.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abcam.** (2010). "Introduction to flow cytometry." from http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry_May_10.pdf.
2. **Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, 3rd, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, Karakousis GC, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Lee JB, Ertel A, Fortina P und Aplin AE** (2013). "Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3." *J Clin Invest* **123**: 2155-2168.
3. **Al-Quraishy S, Delic D, Sies H, Wunderlich F, Abdel-Baki AA und Dkhil MA** (2011). "Differential miRNA expression in the mouse jejunum during garlic treatment of *Eimeria papillata* infections." *Parasitol Res* **109**: 387-394.
4. **Ali S, Ahmad A, Banerjee S, Padhye S, Dominiak K, Schaffert JM, Wang Z, Philip PA und Sarkar FH** (2010). "Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF." *Cancer Res* **70**: 3606-3617.
5. **Ammon HPT und Wahl MA** (1991). "Pharmacology of *Curcuma longa*." *Planta Medica* **57**: 1-7.
6. **Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E und Byers HR** (1998). "Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis." *Mol Med* **4**: 376-383.
7. **Applied Biosystems** "qRT-PCR Handbook."
8. **Backes C, Keller A, Kuentzer J, Kneissl B, Comtesse N, Elnakady YA, Muller R, Meese E und Lenhof HP** (2007). "GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis." *Nucleic Acids Res* **35**: W186-192.
9. **Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK und Kim KW** (2006). "Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1." *Oncol Rep* **15**: 1557-1562.
10. **Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U und Kundu TK** (2004). "Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription." *J Biol Chem* **279**: 51163-51171.
11. **Bao B, Ali S, Banerjee S, Wang Z, Logna F, Azmi AS, Kong D, Ahmad A, Li Y, Padhye S und Sarkar FH** (2012). "Curcumin analogue CDF inhibits pancreatic tumor growth by switching on suppressor microRNAs and attenuating EZH2 expression." *Cancer Res* **72**: 335-345.
12. **Bao B, Ali S, Kong D, Sarkar SH, Wang Z, Banerjee S, Aboukameel A, Padhye S, Philip PA und Sarkar FH** (2011). "Anti-tumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer." *PLoS One* **6**: e17850.
13. **Baselga J und Swain SM** (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." *Nat Rev Cancer* **9**: 463-475.
14. **Bayet-Robert M, Kwiatkowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Durando X, Barthomeuf C und Chollet P** (2010). "Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer." *Cancer Biol Ther* **9**: 8-14.

15. **Benjamini Y und Hochberg Y** (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *J R Statist Soc B* **57**: 289-300
16. **Berridge MV, Herst PM und Tan AS** (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnol Annu Rev* **11**: 127-152.
17. **Bettini S, Vergara D, Bonsegna S, Giotta L, Toto C, Chieppa M, Maffia M, Giovino G, Valli L und Santino A** (2013). "Efficient stabilization of natural curcuminoids mediated by oil body encapsulation." *Rsc Advances* **3**: 5422-5429.
18. **Buac K, Xu M, Cronin J, Weeraratna AT, Hewitt SM und Pavan WJ** (2009). "NRG1 / ERBB3 signaling in melanocyte development and melanoma: inhibition of differentiation and promotion of proliferation." *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 773-784.
19. **Burgess AW** (2008). "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets." *Growth Factors* **26**: 263-274.
20. **Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Pennisi G, Calafato S, Bellia F, Bates TE, Giuffrida Stella AM, Schapira T, Dinkova Kostova AT und Rizzarelli E** (2008). "Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity." *Neurochem Res* **33**: 2444-2471.
21. **Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M und Croce CM** (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2999-3004.
22. **Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, Vareed S, Neuman M, Rodriguez L, Kakarala M, Carpenter PM, McLaren C, Meyskens FL, Jr. und Brenner DE** (2011). "Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia." *Cancer Prev Res (Phila)* **4**: 354-364.
23. **Cen L, Hutzen B, Ball S, DeAngelis S, Chen CL, Fuchs JR, Li C, Li PK und Lin J** (2009). "New structural analogues of curcumin exhibit potent growth suppressive activity in human colorectal carcinoma cells." *BMC Cancer* **9**: 99.
24. **Chainani-Wu N** (2003). "Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*)." *J Altern Complement Med* **9**: 161-168.
25. **Chen A und Xu J** (2005). "Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G447-456.
26. **Chen HW und Huang HC** (1998). "Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* **124**: 1029-1040.
27. **Chen LX, He YJ, Zhao SZ, Wu JG, Wang JT, Zhu LM, Lin TT, Sun BC und Li XR** (2011). "Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model." *Cancer Biol Ther* **11**: 229-235.
28. **Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC und Hsieh CY** (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." *Anticancer Res* **21**: 2895-2900.
29. **Chiu TL und Su CC** (2009). "Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-kappaBp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells." *Int J Mol Med* **23**: 469-475.

30. **Choi BK, Fan X, Deng H, Zhang N und An Z** (2012). "ERBB3 (HER3) is a key sensor in the regulation of ERBB-mediated signaling in both low and high ERBB2 (HER2) expressing cancer cells." *Cancer Med* **1**: 28-38.
31. **Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M und Croce CM** (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13944-13949.
32. **Coban D, Milenkovic D, Chanet A, Khallou-Laschet J, Sabbe L, Palagani A, Vanden Berghe W, Mazur A und Morand C** (2012). "Dietary curcumin inhibits atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration." *Mol Nutr Food Res* **56**: 1270-1281.
33. **Colangelo T, Fucci A, Votino C, Sabatino L, Pancione M, Laudanna C, Binaschi M, Bigioni M, Maggi CA, Parente D, Forte N und Colantuoni V** (2013). "MicroRNA-130b Promotes Tumor Development and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer." *Neoplasia* **15**: 1218-1231.
34. **Cui JG, Li YY, Zhao Y, Bhattacharjee S und Lukiw WJ** (2010). "Differential regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF-kappaB in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease." *J Biol Chem* **285**: 38951-38960.
35. **Dar AA, Majid S, de Semir D, Nosrati M, Bezrookove V und Kashani-Sabet M** (2011). "miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein." *J Biol Chem* **286**: 16606-16614.
36. **Davis CD und Ross SA** (2008). "Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells." *Nutr Rev* **66**: 477-482.
37. **de Gruijl FR, van Kranen HJ und Mullenders LH** (2001). "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer." *J Photochem Photobiol B* **63**: 19-27.
38. **Dinkova-Kostova AT, Abeygunawardana C und Talalay P** (1998). "Chemoprotective properties of phenylpropenoids, bis(benzylidene)cycloalkanones, and related Michael reaction acceptors: correlation of potencies as phase 2 enzyme inducers and radical scavengers." *J Med Chem* **41**: 5287-5296.
39. **DiSilvestro RA, Joseph E, Zhao S und Bomser J** (2012). "Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people." *Nutr J* **11**: 79.
40. **Dunki-Jacobs EM, Callender GG und McMasters KM** (2013). "Current management of melanoma." *Curr Probl Surg* **50**: 351-382.
41. **Edgar R, Domrachev M und Lash AE** (2002). "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository." *Nucleic Acids Res* **30**: 207-210.
42. **Eggermont AM und Robert C** (2011). "New drugs in melanoma: it's a whole new world." *Eur J Cancer* **47**: 2150-2157.
43. **Eigner D und Scholz D** (1999). "Ferula asa-foetida and Curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal." *J Ethnopharmacol* **67**: 1-6.
44. **El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SF und Ahmed AF** (2011). "The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF-alpha and free fatty acids." *Food Chem Toxicol* **49**: 1129-1140.

45. **Esquela-Kerscher A und Slack FJ** (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**: 259-269.
46. **European Food Safety Authority** (2010). "Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive." *EFSA Journal* **8**: 1-46.
47. **Fichtlscherer S, Zeiher AM und Dimmeler S** (2011). "Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 2383-2390.
48. **Fu S und Kurzrock R** (2010). "Development of curcumin as an epigenetic agent." *Cancer* **116**: 4670-4676.
49. **Garbe C und Schadendorf D** (2003). "Malignes Melanom – neue Daten und Konzepte zur Nachsorge." *Deutsches Ärzteblatt* **100**: 1804-1808.
50. **Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold W, Kortmann R-D, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R und Hauschild A** (2008) "Kurzleitlinie - Malignes Melanom der Haut (ICD10 C43)."
51. **Garcea G, Berry DP, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP und Gescher AJ** (2005). "Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**: 120-125.
52. **Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ und Berry DP** (2004). "Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration." *Br J Cancer* **90**: 1011-1015.
53. **Geraldo MV, Yamashita AS und Kimura ET** (2012). "MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer." *Oncogene* **31**: 1910-1922.
54. **Greene SB, Gunaratne PH, Hammond SM und Rosen JM** (2010). "A putative role for microRNA-205 in mammary epithelial cell progenitors." *J Cell Sci* **123**: 606-618.
55. **Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y und Goodall GJ** (2008). "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1." *Nat Cell Biol* **10**: 593-601.
56. **Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A und Enright AJ** (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Research* **34**: 140-144.
57. **Gurtan AM und Sharp PA** (2013). "The role of miRNAs in regulating gene expression networks." *J Mol Biol* **425**: 3582-3600.
58. **Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D und Bondada S** (1999). "Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-XL, NF-kappa B, and p53." *Clin Immunol* **93**: 152-161.
59. **Hanahan D und Folkman J** (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**: 353-364.
60. **Hanahan D und Weinberg RA** (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**: 646-674.
61. **He L und Hannon GJ** (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* **5**: 522-531.

62. **Hlatky L, Hahnfeldt P und Folkman J** (2002). "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us." *J Natl Cancer Inst* **94**: 883-893.
63. **Howell JC, Chun E, Farrell AN, Hur EY, Caroti CM, Iuvone PM und Haque R** (2013). "Global microRNA expression profiling: curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells." *Mol Vis* **19**: 544-560.
64. **Huang CZ, Huang WZ, Zhang G und Tang DL** (2013). "In vivo study on the effects of curcumin on the expression profiles of anti-tumour genes (VEGF, CyclinD1 and CDK4) in liver of rats injected with DEN." *Mol Biol Rep* **40**: 5825-5831.
65. **Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS und Welch DR** (2009). "Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis." *Cancer Res* **69**: 1279-1283.
66. **Hussein MR** (2004). "Genetic pathways to melanoma tumorigenesis." *J Clin Pathol* **57**: 797-801.
67. **Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S und Croce CM** (2007). "MicroRNA signatures in human ovarian cancer." *Cancer Res* **67**: 8699-8707.
68. **Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, Farmer PB, Steward WP und Gescher AJ** (2002). "Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: 105-111.
69. **Irving GR, Howells LM, Sale S, Kralj-Hans I, Atkin WS, Clark SK, Britton RG, Jones DJ, Scott EN, Berry DP, Hemingway D, Miller AS, Brown K, Gescher AJ und Steward WP** (2013). "Prolonged biologically active colonic tissue levels of curcumin achieved after oral administration--a clinical pilot study including assessment of patient acceptability." *Cancer Prev Res (Phila)* **6**: 119-128.
70. **Izzotti A, Cartiglia C, Steele VE und De Flora S** (2012). "MicroRNAs as targets for dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis." *Mutat Res* **751**: 287-303.
71. **Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N und Narayan S** (2002). "Beta-catenin-mediated trans-activation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuloylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells." *Oncogene* **21**: 8414-8427.
72. **Jana NR, Dikshit P, Goswami A und Nukina N** (2004). "Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway." *J Biol Chem* **279**: 11680-11685.
73. **Jones V und Katiyar SK** (2013). "Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion." *Cancer Lett* **335**: 251-258.
74. **Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A und Jung K** (2010). "Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples." *Clin Chem* **56**: 998-1006.
75. **Kanai M, Yoshimura K, Asada M, Imaizumi A, Suzuki C, Matsumoto S, Nishimura T, Mori Y, Masui T, Kawaguchi Y, Yanagihara K, Yazumi S, Chiba T, Guha S und Aggarwal BB** (2011). "A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* **68**: 157-164.

-
76. **Karere GM, Glenn JP, VandeBerg JL und Cox LA** (2012). "Differential microRNA response to a high-cholesterol, high-fat diet in livers of low and high LDL-C baboons." *BMC Genomics* **13**: 320.
77. **Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, Wendschlag A, Giese N, Tjaden C, Ott K, Werner J, Hackert T, Ruprecht K, Huwer H, Huebers J, Jacobs G, Rosenstiel P, Dommisch H, Schaefer A, Müller-Quernheim J, Wullich B, Keck B, Graf N, Reichrath J, Vogel B, Nebel A, Jäger SU, Staehler P, Amarantos I, Boisguerin V, Staehler C, Beier M, Scheffler M, Buchler MW, Wischhusen J, Haeusler SF, Dietl J, Hofmann S, Lenhof HP, Schreiber S, Katus HA, Rottbauer W, Meder B, Hoheisel JD, Franke A und Meese E** (2011). "Toward the blood-borne miRNome of human diseases." *Nat Methods* **8**: 841-843.
78. **Köhler E** (1887). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte, Pabst, G. I-III.
79. **Konur A, Kreutz M, Knuchel R, Krause SW und Andreessen R** (1998). "Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines." *Int J Cancer* **78**: 648-653.
80. **Koumakpayi IH, Le Page C, Mes-Masson AM und Saad F** (2010). "Hierarchical clustering of immunohistochemical analysis of the activated ErbB/PI3K/Akt/NF-kappaB signalling pathway and prognostic significance in prostate cancer." *Br J Cancer* **102**: 1163-1173.
81. **Kudchadkar R, Paraiso KH und Smalley KS** (2012). "Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies." *Cancer J* **18**: 124-131.
82. **Kumar A, Dhawan S, Hardegen NJ und Aggarwal BB** (1998). "Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation." *Biochem Pharmacol* **55**: 775-783.
83. **Kumar G, Tajpara P und Maru G** (2012). "Dietary turmeric post-treatment decreases DMBA-induced hamster buccal pouch tumor growth by altering cell proliferation and apoptosis-related markers." *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **31**: 295-312.
84. **Kunnumakkara AB, Diagaradjane P, Anand P, Harikumar KB, Deorukhkar A, Gelovani J, Guha S, Krishnan S und Aggarwal BB** (2009). "Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model." *Int J Cancer* **125**: 2187-2197.
85. **Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R und Priyadarsini KI** (2008). "Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells." *Biochim Biophys Acta* **1780**: 673-679.
86. **Kunwar A, Barik A, Pandey R und Priyadarsini KI** (2006). "Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study." *Biochim Biophys Acta* **1760**: 1513-1520.
87. **Kurien BT, D'Souza A und Scofield RH** (2010). "Heat-solubilized curry spice curcumin inhibits antibody-antigen interaction in in vitro studies: a possible therapy to alleviate autoimmune disorders." *Mol Nutr Food Res* **54**: 1202-1209.
88. **Kurien BT, Singh A, Matsumoto H und Scofield RH** (2007). "Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment." *Assay Drug Dev Technol* **5**: 567-576.

89. **Laemmli UK** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
90. **Laschke MW, Vollmar B und Menger MD** (2011). "The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue." *Eur Cell Mater* **22**: 147-164; discussion 164-147.
91. **Lee JH, Oh JH und Lee YJ** (2012). "Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2." *Biol Pharm Bull* **35**: 777-780.
92. **Lee RC, Feinbaum RL und Ambros V** (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**: 843-854.
93. **Leidinger P, Keller A, Borries A, Reichrath J, Rass K, Jager SU, Lenhof HP und Meese E** (2010). "High-throughput miRNA profiling of human melanoma blood samples." *BMC Cancer* **10**: 262.
94. **Leyon PV und Kuttan G** (2003). "Studies on the role of some synthetic curcuminoid derivatives in the inhibition of tumour specific angiogenesis." *J Exp Clin Cancer Res* **22**: 77-83.
95. **Li BL, Lu C, Lu W, Yang TT, Qu J, Hong X und Wan XP** (2013). "miR-130b is an EMT-related microRNA that targets DICER1 for aggression in endometrial cancer." *Med Oncol* **30**: 484.
96. **Li L, Ahmed B, Mehta K und Kurzrock R** (2007). "Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer." *Mol Cancer Ther* **6**: 1276-1282.
97. **Liang G, Shao L, Wang Y, Zhao C, Chu Y, Xiao J, Zhao Y, Li X und Yang S** (2009). "Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents." *Bioorg Med Chem* **17**: 2623-2631.
98. **Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A und Dunn FW** (1997). "Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice." *Cancer Lett* **116**: 197-203.
99. **Lin F, Wang X, Jie Z, Hong X, Li X, Wang M und Yu Y** (2011). "Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **31**: 509-514.
100. **Litz J und Krystal GW** (2006). "Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1 α activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells." *Mol Cancer Ther* **5**: 1415-1422.
101. **Liu H, Liang Y, Wang L, Tian L, Song R, Han T, Pan S und Liu L** (2012). "In vivo and in vitro suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog." *PLoS One* **7**: e48075.
102. **Liu S, Tetzlaff MT, Liu A, Liegl-Atzwanger B, Guo J und Xu X** (2012). "Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression." *Lab Invest* **92**: 1084-1096.
103. **Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L und Zhang C** (2012). "Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application." *J Mol Cell Cardiol* **52**: 245-255.
104. **Liu Z, Xie Z, Jones W, Pavlovicz RE, Liu S, Yu J, Li PK, Lin J, Fuchs JR, Marcucci G, Li C und Chan KK** (2009). "Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent." *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 706-709.

105. **Lollini PL, De Giovanni C, Del Re B, Nicoletti G, Prodi G und Nanni P** (1987). "Interferon-mediated enhancement of metastasis. Are MHC antigens involved?" *Clin Exp Metastasis* **5**: 277-287.
106. **Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR und Golub TR** (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature* **435**: 834-838.
107. **Luthra PM, Kumar R und Prakash A** (2009). "Demethoxycurcumin induces Bcl-2 mediated G2/M arrest and apoptosis in human glioma U87 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **384**: 420-425.
108. **Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark HL und Bertagnolli MM** (2000). "Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis." *Carcinogenesis* **21**: 921-927.
109. **Masuda T, Hidaka K, Shinohara A, Maekawa T, Takeda Y und Yamaguchi H** (1999). "Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin." *J Agric Food Chem* **47**: 71-77.
110. **Masuda T, Jitoe A, Isobe J, Nakatani N und Yonemori S** (1993). "Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *curcuma domestica*." *Phytochemistry* **32**: 1557-1560.
111. **Mazar J, DeYoung K, Khaitan D, Meister E, Almodovar A, Goydos J, Ray A und Perera RJ** (2010). "The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness." *PLoS One* **5**: e13779.
112. **Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Just S, Borries A, Rudloff J, Leidinger P, Meese E, Katus HA und Rottbauer W** (2011). "MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction." *Basic Res Cardiol* **106**: 13-23.
113. **Menger MD, Laschke MW und Vollmar B** (2002). "Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber." *Eur Surg Res* **34**: 83-91.
114. **Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M, Bonanno E, Muto G, Frajese GV, De Maria R, Spagnoli LG, Farace MG und Ciafre SA** (2008). "The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice." *PLoS One* **3**: e4029.
115. **Mohandas KM und Desai DC** (1999). "Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel." *Indian J Gastroenterol* **18**: 118-121.
116. **Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T und Hasegawa K** (2008). "The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats." *J Clin Invest* **118**: 868-878.
117. **Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, Osterlund P, Knuutila S und Sarhadi VK** (2012). "MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF." *Cancer Genet.*
118. **Nagabhushan M und Bhide SV** (1986). "Nonmutagenicity of curcumin and its antimutagenic action versus chili and capsaicin." *Nutr Cancer* **8**: 201-210.

-
119. **National Cancer Institute**. (2013). "fact sheets." from <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/moles>.
120. **Newcomb EW, Silverstein SC und Silagi S** (1978). "Malignant mouse melanoma cells do not form tumors when mixed with cells of a non-malignant subclone: relationships between plasminogen activator expression by the tumor cells and the host's immune response." *J Cell Physiol* **95**: 169-177.
121. **Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A und Ribatti D** (2008). "Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra." *Histol Histopathol* **23**: 601-607.
122. **Noguchi S, Iwasaki J, Kumazaki M, Mori T, Maruo K, Sakai H, Yamada N, Shimada K, Naoe T, Kitade Y und Akao Y** (2013). "Chemically modified synthetic microRNA-205 inhibits the growth of melanoma cells in vitro and in vivo." *Mol Ther* **21**: 1204-1211.
123. **Nugroho AE, Yuniarti N, Istyastono EP, Supardjan M, Maeyama K und Hakim L** (2009). "Anti-allergic effects of 1,5-bis(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one on mast cell-mediated allergy model." *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences* **7**: 51-71.
124. **Odote J, Albert P, Carlier A, Tarpin M, Devy J und Madoulet C** (2004). "In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells." *Int J Cancer* **111**: 381-387.
125. **Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M und Tanaka M** (2011). "MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer." *Ann Surg Oncol* **18**: 2381-2387.
126. **Okunieff P, Xu J, Hu D, Liu W, Zhang L, Morrow G, Pentland A, Ryan JL und Ding I** (2006). "Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**: 890-898.
127. **Pan MH, Huang TM und Lin JK** (1999). "Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice." *Drug Metab Dispos* **27**: 486-494.
128. **Panahi Y, Sahebkar A, Amiri M, Davoudi SM, Beiraghdar F, Hoseininejad SL und Kolivand M** (2012). "Improvement of sulphur mustard-induced chronic pruritus, quality of life and antioxidant status by curcumin: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Br J Nutr* **108**: 1272-1279.
129. **Parasramka MA, Dashwood WM, Wang R, Abdelli A, Bailey GS, Williams DE, Ho E und Dashwood RH** (2012). "MicroRNA profiling of carcinogen-induced rat colon tumors and the influence of dietary spinach." *Mol Nutr Food Res* **56**: 1259-1269.
130. **Park SY und Kim DS** (2002). "Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease." *J Nat Prod* **65**: 1227-1231.
131. **Phillips JM, Clark C, Herman-Ferdinand L, Moore-Medlin T, Rong X, Gill JR, Clifford JL, Abreo F und Nathan CO** (2011). "Curcumin inhibits skin squamous cell carcinoma tumor growth in vivo." *Otolaryngol Head Neck Surg* **145**: 58-63.
132. **Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S und Howells L** (1999). "Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex." *Oncogene* **18**: 6013-6020.
133. **Pogribny IP, James SJ und Beland FA** (2012). "Molecular alterations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency." *Mol Nutr Food Res* **56**: 116-125.

134. Poliseno L, Haimovic A, Segura MF, Hanniford D, Christos PJ, Darvishian F, Wang J, Shapiro RL, Pavlick AC, Berman RS, Hernando E, Zavadil J und Osman I (2012). "Histology-specific microRNA alterations in melanoma." *J Invest Dermatol* **132**: 1860-1868.
135. Prathapan A, Lukhman, M, Arumughan, C, Sundaresan, A und Raghu, KG (2009). "Effect of heat treatment on curcuminoid, colour value and total polyphenols of fresh turmeric rhizome." *International Journal of Food Science & Technology*: 1438-1444.
136. Quincoces Suarez JA, Rando DG, Santos RP, Goncalves CP, Ferreira E, de Carvalho JE, Kohn L, Maria DA, Faiao-Flores F, Michalik D, Marcucci MC und Vogel C (2010). "New antitumoral agents I: In vitro anticancer activity and in vivo acute toxicity of synthetic 1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one and derivatives." *Bioorg Med Chem* **18**: 6275-6281.
137. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, Mathew A, Cooper N, Kao R und Sinha R (2008). "Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US." *Int J Epidemiol* **37**: 147-160.
138. Ravindranath V und Chandrasekhara N (1980). "Absorption and tissue distribution of curcumin in rats." *Toxicology* **16**: 259-265.
139. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I und Hatzigeorgiou AG (2012). "Functional microRNA targets in protein coding sequences." *Bioinformatics*. **28**: 771-776.
140. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR und Ruvkun G (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature*. **403**: 901-6.
141. Robert-Koch-Institut (2012). "Krebs in Deutschland 2007/2008." *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut*: 60-64.
142. Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K, Akasaka T und Masuda T (2011). "Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells." *Int J Oncol* **39**: 665-672.
143. Sand M, Skrygan M, Georgas D, Sand D, Gambichler T, Altmeyer P und Bechara FG (2012). "The miRNA machinery in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases and benign melanocytic nevi." *Cell Tissue Res* **350**: 119-126.
144. Sasikumar B (2005). "Genetic resources of Curcuma: diversity, characterization and utilization." *Plant Genetic Resources* **3**: 230-251.
145. Sharma RA, Gescher AJ und Steward WP (2005). "Curcumin: the story so far." *Eur J Cancer* **41**: 1955-1968.
146. Sharma RA, Ireson CR, Verschoye RD, Hill KA, Williams ML, Leuratti C, Manson MM, Marnett LJ, Steward WP und Gescher A (2001). "Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels." *Clin Cancer Res* **7**: 1452-1458.
147. Shehzad A, Lee J und Lee YS (2013). "Curcumin in various cancers." *Biofactors* **39**: 56-68.
148. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R und Srinivas PS (1998). "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers." *Planta Med* **64**: 353-356.

149. Shu L, Khor TO, Lee JH, Boyanapalli SS, Huang Y, Wu TY, Saw CL, Cheung KL und Kong AN (2011). "Epigenetic CpG demethylation of the promoter and reactivation of the expression of Neurog1 by curcumin in prostate LNCaP cells." *AAPS J* 13: 606-614.
150. Singh AK, Sidhu GS, Deepa T und Maheshwari RK (1996). "Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell." *Cancer Lett* 107: 109-115.
151. Sinha R, Anderson DE, McDonald SS und Greenwald P (2003). "Cancer risk and diet in India." *J Postgrad Med* 49: 222-228.
152. Sittisomwong N, Leelasangaluk V, Chivapt S, Wangmad A, Ragsaman P und Chuntarachaya C (1991). "Acute and Subchronic Toxicity of Turmeric." *Bulletin of Medical Sciences (Thailand)* 32: 101-111.
153. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M und Nathanson KL (2008). "Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas." *Mol Cancer Ther* 7: 2876-2883.
154. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK und Ribas A (2012). "Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib." *N Engl J Med* 366: 707-714.
155. Soubani O, Ali AS, Logna F, Ali S, Philip PA und Sarkar FH (2012). "Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer." *Carcinogenesis* 33: 1563-1571.
156. Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR und Menon VP (2007). "Modulatory effects of curcumin on gamma-radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes." *Environ Toxicol Pharmacol* 24: 98-105.
157. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS und Sessa WC (2007). "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells." *Circ Res* 100: 1164-1173.
158. Subramaniam D, Ponnuram S, Ramamoorthy P, Standing D, Battafarano RJ, Anant S und Sharma P (2012). "Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling." *PLoS One* 7: e30590.
159. Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH und Kurzrock R (2008). "Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells." *Mol Cancer Ther* 7: 464-473.
160. Suresh D, Gurudutt KN und Srinivasan K (2009). "Degradation of bioactive spice compound: curcumin during domestic cooking." *Eur Food Res Technol*: 807-812.
161. Suresh D und Srinivasan K (2007). "Studies on the in vitro absorption of spice principles--curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines." *Food Chem Toxicol* 45: 1437-1442.
162. Surh YJ (2003). "Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals." *Nat Rev Cancer* 3: 768-780.
163. Taby R und Issa JP (2010). "Cancer epigenetics." *CA Cancer J Clin* 60: 376-392.
164. Tan X, Qin W, Zhang L, Hang J, Li B, Zhang C, Wan J, Zhou F, Shao K, Sun Y, Wu J, Zhang X, Qiu B, Li N, Shi S, Feng X, Zhao S, Wang Z, Zhao X, Chen Z, Mitchelson K,

- Cheng J, Guo Y und He J** (2011). "A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis." *Clin Cancer Res* **17**: 6802-6811.
- 165. Tanabe M und Kanehisa M** (2012). "Using the KEGG database resource." *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 1*: Unit1 12.
- 166. Thakkar A, Sutaria D, Grandhi BK, Wang J und Prabhu S** (2013). "The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer." *Oncol Rep* **29**: 1671-1677.
- 167. Thangapazham RL, Sharad S und Maheshwari RK** (2013). "Skin regenerative potentials of curcumin." *Biofactors* **39**: 141-149.
- 168. Thomas SL, Zhong D, Zhou W, Malik S, Liotta D, Snyder JP, Hamel E und Giannakakou P** (2008). "EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1." *Cell Cycle* **7**: 2409-2417.
- 169. Tonnesen HH** (2002). "Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII." *Pharmazie* **57**: 820-824.
- 170. Tonnesen HH und Karlsen J** (1985). "Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution." *Z Lebensm Unters Forsch* **180**: 402-404.
- 171. Tung YT, Chen HL, Lai CW, Shen CJ, Lai YW und Chen CM** (2011). "Curcumin reduces pulmonary tumorigenesis in vascular endothelial growth factor (VEGF)-overexpressing transgenic mice." *Mol Nutr Food Res* **55**: 1036-1043.
- 172. Universal Commodity Exchange I** (2012). "Turmeric." <http://www.ucxindia.com/Turmeric/>.
- 173. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z und Brenner DE** (2008). "Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**: 1411-1417.
- 174. Vasudevan S, Tong Y und Steitz JA** (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." *Science* **318**: 1931-1934.
- 175. Vera J, Schmitz U, Lai X, Engelmann D, Khan FM, Wolkenhauer O und Putzer BM** (2013). "Kinetic modeling-based detection of genetic signatures that provide chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 network." *Cancer Res* **73**: 3511-3524.
- 176. Verdoodt B, Neid M, Vogt M, Kuhn V, Liffers ST, Palisaar RJ, Noldus J, Tannapfel A und Mirmohammadsadegh A** (2013). "MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer." *Int J Oncol* **43**: 307-314.
- 177. Wahlstrom B und Blennow G** (1978). "A study on the fate of curcumin in the rat." *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **43**: 86-92.
- 178. Wang N, Li Q, Feng NH, Cheng G, Guan ZL, Wang Y, Qin C, Yin CJ und Hua LX** (2013). "miR-205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth." *Asian J Androl* **15**: 735-741.
- 179. Wang S, Huang J, Lyu H, Lee CK, Tan J, Wang J und Liu B** (2013). "Functional co-operation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells." *Cell Death Dis* **4**: e556.
- 180. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY und Lin JK** (1997). "Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products." *J Pharm Biomed Anal* **15**: 1867-1876.

-
181. **Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Heynekamp JJ, Orlando RA, Deck LM und Vander Jagt DL** (2006). "TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin." *Biochem Pharmacol* **72**: 928-940.
182. **Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjot L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostenfeld MS, Borre M, Peter ME, Orntoft TF, Kjems J und Clark SJ** (2011). "Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer." *Int J Cancer* **128**: 1327-1334.
183. **Woermann U** (2000). "Die manuelle (mikroskopische) Zellzählung." from http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm.
184. **World Health Organization** (2011). "CAUSES OF DEATH 2008 SUMMARY TABLES." from <http://www.who.int/evidence/bod>.
185. **Xu Y, Brenn T, Brown ER, Doherty V und Melton DW** (2012). "Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors." *Br J Cancer* **106**: 553-561.
186. **Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA und Gautam SC** (1997). "Curcumin inhibits IL1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NF-kB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells." *Hematopathol Mol Hematol* **11**: 49-62.
187. **Zhang J, Du Y, Wu C, Ren X, Ti X, Shi J, Zhao F und Yin H** (2010). "Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway." *Oncol Rep* **24**: 1217-1223.
188. **Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, Liu Y, Gao Z, Li J, Shen L und Lu Y** (2011). "Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection." *Ann Oncol* **22**: 2257-2266.
189. **Zhongfa L, Chiu M, Wang J, Chen W, Yen W, Fan-Havard P, Yee LD und Chan KK** (2012). "Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice." *Cancer Chemother Pharmacol* **69**: 679-689.

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht für die initiale Idee zu dieser Arbeit sowie der Bereitstellung von Mitteln und der Betreuung im ersten Teil meiner Zeit als Doktorandin im Carreras Institut für Immun- und Gentherapie.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eckart Meese für die weiterführende Betreuung, Mittel und seine dauernde Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei PD Dr. Matthias W. Laschke möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und unermüdliche Hilfe in der Vollendung meiner Projekte und Schriftsachen, von diversen Anträgen bis hin zu meiner Doktorarbeit, danken.

Prof. Dr. Michael D. Menger möchte ich dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, meine Arbeit im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes fortzusetzen, und immer mit einem offenen Ohr und konstruktiver Kritik zur Verfügung stand.

Dr. Stefan Böttcher danke ich für die andauernde, unkomplizierte und erfolgreiche Kooperation.

Auch Dr. Petra Leidinger und Dr. Christina Backes möchte ich für die gute, erfolgreiche Zusammenarbeit sowie ihre Geduld im Umgang mit einer unbegabten Statistikerin danken.

Prof. Dr. Pfreundschuh möchte ich dafür danken, dass ich weiterhin eigenständig Versuche im Carreras Institut für Immun- und Gentherapie durchführen darf.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit. Mit vielen Ratschlägen, Leckereien und Späßen haben sie den wissenschaftlichen Alltag aufgehellt.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund dafür danken, dass sie mich all diese Jahre hinweg getragen und ertragen haben – ich liebe Euch!

Alle diese Personen haben mich während meiner Doktorarbeit weit über das Übliche hinaus unterstützt und immer wieder ermutigt. Ich bin froh, ihnen begegnet zu sein, und dankbar für ihren Beitrag!

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Indra Navina Dahmke
Adresse Schumannstr. 26
66111 Saarbrücken
Geburtsdatum 01/12/1979
Geburtsort Koblenz

Ausbildung

09/2007 **Diplom: Humanbiologie**
Diplomarbeit: *“Expression von Adhäsionsmolekülen und Signaltransduktion in Wirtszellen durch Intermediate der GPI-Biosynthese von Plasmodium falciparum“*

10/2001-09/2007 **Studium der Humanbiologie**
Philipps-Universität, Marburg

10/1999-09/2001 **Studium der Humanmedizin**
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

06/1999 **Abitur**
Max-von-Laue Gymnasium, Koblenz

Beruflicher Werdegang

11/2009-heute **Promotion**
Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Prof. M.D. Menger und José Carreras Forschungsinstitut für Immun- und Gentherapie, Prof. U. Mahlke, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg

08/2008-10/2009 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Experimentelle Pneumologie: AG „Inflammation und Regeneration“
Forschungsinstitut Borstel

01-07/2008 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Section of Human Engineering
Korea Institute of Science and Technology, Saarbrücken

03/2000-03/2001 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Abteilung für Parasitologie, Hygiene Institut
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

07-09/1999 **Praktikum**
Department of Biochemistry and Molecular Biology
Monash University, Melbourne, Australia

9. Publikationen

Schleithoff C, Voelter-Mahlknecht S, **Dahmke IN** und Mahlknecht U. (2012). „On the epigenetics of vascular regulation and disease”. *Clin Epigenetics* **4**: 7

Dahmke IN, Backes C, Rudzitis-Auth J, Laschke MW, Leidinger P, Menger MD, Meese E und Mahlknecht U. (2013). „Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered.” *PLoS One* **8**: e81122.

Dahmke IN, Boettcher SP, Groh M, Mahlknecht U. (2014) “Cooking enhances curcumin anti-carcinogenic activity through pyrolytic formation of "deketene curcumin". *Food Chem* **151**: 514-9.

Leidinger P, Backes C, **Dahmke IN**, Galata V, Huwer H, Stehle I, Keller A, Bals R., und Meese E. „What makes a blood cell based miRNA expression pattern disease specific? - A miRNome analysis of blood cell subsets in lung cancer patients and healthy controls”. Eingereicht bei *Genome Biology*.

Dahmke IN und Mahlknecht U. „Epigenetic active phytochemicals in cancer prevention and therapy”. Manuskript zur Veröffentlichung fertig gestellt

Kongressbeiträge

Purrucker JC, **Dahmke IN** und Mahlknecht U (2010). “Emerging epigenetic treatment strategies in oncology and potential hazards”. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: Jahrestagung*. Poster

Dahmke IN und Mahlknecht U (2011). „Controversial discussion on the use of epigenetic active phytochemicals in tumour therapy”. *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: Jahrestagung*. Poster

Dahmke IN (2013). “Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered”. *Chirurgische Forschungstage*. Vortrag

10. Anhang

Normalisierte Expressionsdaten der tumoralen miRNAs

Diese Tabelle listet alle durch Curcumin signifikant regulierten miRNAs aus B78H1 Tumoren auf, wie sie mit dem Sure Print G3 miRNA V17.0 Microarray Chip (Agilent Technologies) basierend auf miRBase 17.0 detektiert wurden. Dargestellt sind jeweils die Medianwerte der exprimierten miRNA für Curcumin-behandelte und Kontrolltiere, die Differenz als $\Delta \log$ Median sowie der adjustierte *t*-test (*t*-test adjp.), die *area under the curve* (AUC) und Änderung bezogen auf Curcumin als n-facher Median.

Tab. 9: Signifikante differentielle Expression tumoraler miRNAs nach Curcumin-Diät

miRNA	Median Curcumin	Median Kontrolle	$\Delta \log$ Median	t-test adjp	AUC	n-facher Median
mmu-miR-211-5p	4,212	9,371	-5,158	0,039	0,929	0,028
mmu-miR-3096-5p	5,063	7,549	-2,486	0,013	1,000	0,178
mmu-miR-711	0,894	3,068	-2,174	0,016	0,976	0,222
mmu-miR-466h-5p	3,671	5,799	-2,128	0,049	0,905	0,229
mmu-miR-130b-3p	6,166	8,210	-2,044	0,013	0,952	0,242
mmu-miR-3082-5p	8,102	10,146	-2,044	0,036	0,929	0,242
mmu-miR-1199-5p	-1,292	0,646	-1,938	0,023	1,000	0,261
mmu-miR-669b-5p	3,933	5,701	-1,768	0,049	0,905	0,294
mmu-miR-1187	7,819	9,564	-1,745	0,049	0,905	0,298
mmu-miR-1224-5p	9,522	11,266	-1,744	0,010	0,976	0,299
mmu-miR-301b-3p	2,561	4,279	-1,718	0,008	0,976	0,304
mmu-miR-574-5p	9,181	10,831	-1,650	0,040	0,929	0,319
mmu-miR-18a-5p	6,327	7,949	-1,622	0,009	0,952	0,325
mmu-miR-3057-5p	1,310	2,879	-1,569	0,015	1,000	0,337
mmu-miR-5109	11,480	13,038	-1,558	0,019	0,940	0,340
mmu-miR-2137	6,911	8,411	-1,501	0,026	1,000	0,353
mmu-miR-5103	2,869	4,361	-1,492	0,024	1,000	0,356
mmu-miR-3096b-5p	3,706	5,149	-1,443	0,016	1,000	0,368
mmu-miR-20a-5p	9,093	10,505	-1,411	0,025	0,976	0,376
mmu-miR-362-5p	3,882	5,234	-1,352	0,021	0,952	0,392
mmu-miR-2861	8,165	9,500	-1,335	0,019	1,000	0,396
mmu-miR-188-5p	6,911	8,227	-1,316	0,027	1,000	0,402
mmu-miR-5097	10,512	11,799	-1,287	0,019	0,929	0,410
mmu-miR-5105	8,210	9,455	-1,246	0,036	0,905	0,422
mmu-miR-714	4,085	5,323	-1,238	0,023	0,952	0,424

miRNA	Median Curcumin	Median Kontrolle	Δ log Median	t-test adjp	AUC	n-facher Median
mmu-miR-211-5p	4,212	9,371	-5,158	0,039	0,929	0,028
mmu-miR-3096-5p	5,063	7,549	-2,486	0,013	1,000	0,178
mmu-miR-711	0,894	3,068	-2,174	0,016	0,976	0,222
mmu-miR-532-5p	6,056	7,280	-1,224	0,025	0,952	0,428
mmu-miR-2182	2,510	3,715	-1,204	0,004	1,000	0,434
mmu-miR-19b-3p	9,093	10,249	-1,155	0,010	0,976	0,449
mmu-miR-1306-3p	4,156	5,288	-1,132	0,022	0,952	0,456
mmu-miR-129-5p	1,322	2,385	-1,062	0,015	0,976	0,479
mmu-miR-362-3p	5,946	7,002	-1,056	0,010	0,952	0,481
mmu-miR-326-3p	3,795	4,819	-1,024	0,027	0,952	0,492
mmu-miR-128-3p	5,288	6,311	-1,022	0,022	0,952	0,492
mmu-miR-20b-5p	7,675	8,683	-1,008	0,017	0,952	0,497
mmu-miR-3960	10,130	11,122	-0,993	0,038	0,881	0,502
mmu-miR-19a-3p	6,341	7,315	-0,974	0,005	0,976	0,509
mmu-miR-680	4,890	5,789	-0,899	0,019	0,952	0,536
mmu-miR-5131	3,919	4,811	-0,892	0,025	1,000	0,539
mmu-miR-5126	11,480	12,343	-0,863	0,047	0,917	0,550
mmu-miR-3095-3p	3,121	3,921	-0,800	0,014	1,000	0,574
mmu-miR-25-3p	8,135	8,927	-0,792	0,026	0,929	0,578
mmu-miR-324-5p	6,783	7,553	-0,770	0,028	0,964	0,587
mmu-miR-1901	3,202	3,961	-0,759	0,039	0,940	0,591
mmu-miR-500-3p	7,373	8,119	-0,745	0,011	0,952	0,597
mmu-miR-351-3p	4,264	4,996	-0,732	0,015	0,988	0,602
mmu-miR-130a-3p	10,011	10,702	-0,692	0,015	0,964	0,619
mmu-miR-1982-5p	5,510	6,191	-0,681	0,043	1,000	0,624
mmu-miR-187-5p	1,536	2,185	-0,649	0,015	1,000	0,638
mmu-miR-483-5p	4,636	5,284	-0,648	0,020	1,000	0,638
mmu-miR-804	2,884	3,519	-0,636	0,025	0,976	0,644
mmu-miR-290-5p	4,376	5,006	-0,630	0,047	0,869	0,646
mmu-miR-760-5p	2,150	2,777	-0,627	0,020	1,000	0,648
mmu-miR-1249-3p	5,729	6,338	-0,609	0,044	0,881	0,656
mmu-miR-712-3p	1,552	2,151	-0,600	0,043	1,000	0,660
mmu-miR-92a-3p	8,135	8,723	-0,587	0,041	0,893	0,666
mmu-miR-210-3p	8,808	9,363	-0,556	0,033	0,988	0,680
mmu-miR-1965	1,369	1,896	-0,527	0,029	0,976	0,694
mmu-miR-5120	2,449	2,954	-0,506	0,034	0,952	0,704

miRNA	Median Curcumin	Median Kontrolle	Δ log Median	t-test adjp	AUC	n-facher Median
mmu-miR-211-5p	4,212	9,371	-5,158	0,039	0,929	0,028
mmu-miR-3096-5p	5,063	7,549	-2,486	0,013	1,000	0,178
mmu-miR-711	0,894	3,068	-2,174	0,016	0,976	0,222
mmu-miR-31-3p	7,348	7,769	-0,421	0,025	0,976	0,747
mmu-miR-3060-5p	1,829	2,227	-0,398	0,049	0,929	0,759
mmu-miR-483-3p	4,357	4,702	-0,344	0,019	1,000	0,788
mmu-miR-875-5p	1,938	1,758	0,179	0,047	0,024	1,132
mmu-miR-872-3p	2,789	2,501	0,287	0,034	0,048	1,220
mmu-miR-409-5p	2,143	1,841	0,302	0,046	0,024	1,233
mmu-miR-450a-1-3p	1,367	1,042	0,325	0,047	0,048	1,253
mmu-miR-152-5p	1,784	1,437	0,347	0,044	0,095	1,272
mmu-miR-191-5p	1,849	1,486	0,363	0,033	0,024	1,286
mmu-miR-190-5p	2,128	1,748	0,380	0,019	0,024	1,302
mmu-miR-100-3p	2,301	1,903	0,397	0,014	0,000	1,317
mmu-miR-29a-5p	2,667	2,251	0,416	0,026	0,036	1,334
mmu-miR-23a-3p	11,245	10,812	0,433	0,019	0,048	1,350
mmu-miR-181c-5p	3,027	2,551	0,477	0,044	0,048	1,392
mmu-miR-23b-5p	1,184	0,689	0,494	0,006	0,000	1,409
mmu-miR-135b-5p	2,974	2,453	0,521	0,008	0,000	1,435
mmu-miR-154-3p	2,648	2,105	0,544	0,030	0,000	1,458
mmu-miR-320-3p	5,968	5,412	0,556	0,040	0,071	1,470
mmu-miR-224-5p	2,504	1,946	0,558	0,016	0,000	1,473
mmu-miR-351-5p	3,784	3,193	0,591	0,047	0,048	1,506
mmu-miR-350-3p	7,186	6,564	0,622	0,044	0,119	1,539
mmu-miR-139-5p	2,842	2,216	0,626	0,022	0,000	1,543
mmu-miR-411-5p	2,875	2,189	0,685	0,043	0,024	1,608
mmu-miR-28c	3,340	2,646	0,694	0,015	0,048	1,618
mmu-miR-802-5p	2,892	2,193	0,699	0,016	0,000	1,624
mmu-miR-125a-5p	7,904	7,196	0,708	0,013	0,000	1,633
mmu-miR-3068-3p	3,680	2,888	0,792	0,028	0,012	1,731
mmu-miR-335-5p	3,005	2,189	0,815	0,010	0,000	1,760
mmu-miR-146a-5p	6,946	6,124	0,821	0,027	0,000	1,767
mmu-miR-27b-3p	9,614	8,787	0,827	0,017	0,024	1,774
mmu-miR-151-5p	9,165	8,300	0,864	0,015	0,012	1,820
mmu-miR-99b-5p	7,207	6,317	0,890	0,008	0,012	1,853
mmu-miR-455-5p	3,900	2,999	0,901	0,022	0,071	1,868

miRNA	Median Curcumin	Median Kontrolle	Δ log Median	t-test adjp	AUC	n-facher Median
mmu-miR-211-5p	4,212	9,371	-5,158	0,039	0,929	0,028
mmu-miR-3096-5p	5,063	7,549	-2,486	0,013	1,000	0,178
mmu-miR-711	0,894	3,068	-2,174	0,016	0,976	0,222
mmu-miR-542-3p	5,063	4,157	0,906	0,035	0,119	1,874
mmu-miR-223-3p	7,348	6,405	0,943	0,031	0,000	1,923
mmu-let-7e-5p	9,016	8,058	0,958	0,015	0,048	1,942
mmu-miR-218-5p	3,012	2,050	0,962	0,004	0,000	1,948
mmu-miR-24-2-5p	5,905	4,939	0,966	0,016	0,048	1,953
mmu-miR-425-5p	6,193	5,223	0,970	0,007	0,000	1,958
mmu-miR-219-5p	5,370	4,394	0,976	0,040	0,095	1,966
mmu-miR-26a-5p	10,512	9,500	1,012	0,005	0,012	2,017
mmu-miR-450b-3p	4,273	3,259	1,014	0,050	0,119	2,019
mmu-miR-222-5p	2,365	1,350	1,014	0,015	0,000	2,020
mmu-miR-24-1-5p	4,687	3,603	1,084	0,022	0,048	2,119
mmu-miR-26b-5p	8,549	7,435	1,114	0,010	0,060	2,165
mmu-miR-193b-3p	3,326	2,168	1,157	0,005	0,000	2,231
mmu-miR-29b-1-5p	4,070	2,909	1,161	0,009	0,000	2,236
mmu-miR-29c-3p	8,960	7,762	1,198	0,005	0,000	2,294
mmu-miR-100-5p	8,401	7,192	1,209	0,016	0,048	2,311
mmu-miR-10a-5p	4,503	3,219	1,284	0,012	0,000	2,436
mmu-miR-23b-3p	10,512	9,224	1,288	0,013	0,000	2,442
mmu-miR-206-3p	6,488	5,197	1,292	0,046	0,071	2,448
mmu-miR-1839-5p	5,492	4,195	1,297	0,009	0,000	2,457
mmu-miR-183-5p	7,591	6,185	1,405	0,019	0,048	2,649
mmu-miR-34b-3p	4,450	3,037	1,413	0,022	0,048	2,664
mmu-miR-155-5p	5,311	3,881	1,430	0,010	0,000	2,695
mmu-miR-450a-5p	6,026	4,563	1,463	0,031	0,131	2,756
mmu-miR-152-3p	8,960	7,497	1,463	0,015	0,024	2,757
mmu-miR-10b-5p	4,687	3,221	1,466	0,010	0,000	2,762
mmu-miR-511-3p	5,644	4,113	1,531	0,013	0,000	2,890
mmu-miR-96-5p	8,808	7,272	1,535	0,029	0,036	2,898
mmu-miR-503-5p	7,321	5,712	1,608	0,013	0,000	3,049
mmu-miR-29a-3p	12,035	10,406	1,629	0,005	0,000	3,093
mmu-miR-148a-3p	4,432	2,639	1,793	0,004	0,000	3,464
mmu-miR-214-3p	4,503	2,662	1,842	0,010	0,000	3,585
mmu-miR-322-5p	9,850	7,985	1,866	0,005	0,012	3,644

miRNA	Median Curcumin	Median Kontrolle	Δ log Median	t-test adjp	AUC	n-facher Median
mmu-miR-211-5p	4,212	9,371	-5,158	0,039	0,929	0,028
mmu-miR-3096-5p	5,063	7,549	-2,486	0,013	1,000	0,178
mmu-miR-711	0,894	3,068	-2,174	0,016	0,976	0,222
mmu-miR-125b-5p	11,382	9,514	1,868	0,003	0,000	3,651
mmu-miR-29b-3p	10,860	8,929	1,931	0,005	0,024	3,814
mmu-miR-22-5p	5,120	3,099	2,021	0,003	0,000	4,059
mmu-miR-34c-3p	5,177	3,142	2,035	0,009	0,000	4,099
mmu-miR-199a-5p	6,488	4,449	2,040	0,015	0,000	4,112
mmu-miR-34c-5p	8,370	6,304	2,066	0,009	0,000	4,188
mmu-miR-150-5p	4,273	2,043	2,230	0,004	0,000	4,692
mmu-miR-142-3p	8,279	6,041	2,238	0,009	0,000	4,718
mmu-miR-199b-5p	9,246	7,007	2,239	0,003	0,000	4,720
mmu-miR-199a-3p	9,328	7,076	2,252	0,006	0,000	4,763
mmu-miR-34b-5p	9,127	6,864	2,263	0,006	0,024	4,801
mmu-miR-22-3p	10,644	8,322	2,322	0,006	0,024	5,001
mmu-miR-338-3p	5,982	3,550	2,432	0,003	0,000	5,397
mmu-miR-140-5p	11,614	9,148	2,466	0,004	0,000	5,524
mmu-miR-142-5p	5,998	3,362	2,636	0,005	0,000	6,217
mmu-miR-140-3p	12,133	9,400	2,733	0,003	0,000	6,647
mmu-miR-221-3p	6,327	3,592	2,735	0,004	0,024	6,658
mmu-miR-21-3p	6,327	3,546	2,782	0,003	0,000	6,877
mmu-miR-21-5p	13,762	10,925	2,838	0,028	0,048	7,148
mmu-miR-146b-5p	6,659	3,776	2,883	0,005	0,000	7,379
mmu-miR-205-3p	2,561	-0,631	3,192	0,010	0,024	9,137
mmu-miR-222-3p	5,968	2,737	3,231	0,003	0,000	9,392
mmu-miR-205-5p	10,300	3,218	7,082	0,025	0,000	135,506